

Aus dem Anatomischen Institut
der Universität Basel, Schweiz
Abteilung Neuroentwicklung
Leiter: Prof. Dr. J. Kapfhammer

und

dem Institut für Anatomie I
der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Direktor: Prof. Dr. Dr. C. Redies

DIE DENDRITENENTWICKLUNG VON PURKINJEZELLEN DURCH GLUTAMATREZEPTORGESTEUERTE SIGNALWEGE

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Judith Zeyse

geboren am 04. August 1977 in Hamburg

Gutachter:

1.:

2.:

3.:

Tag der öffentlichen Verteidigung:

*„Es gibt nichts praktischeres
als eine gute Theorie“*

Immanuel Kant

Meinen Eltern gewidmet.

ABKÜRZUNGEN

AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-1-4-isoxazylpropionat
ATP	Adenosintri-phosphat
APV	DL-2-Amino-5-phosphonovaleric acid, NMDA-Rezeptor Blocker
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
Ca^{2+}	Kalzium
CamKII	Kalzium-Kalmodulin-Kinase II
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CB6 / CB6F1	Kreuzung aus Balb C und Black 6 Mäusen / Erste Tochtergeneration aus CB6-Mäusen
Chel	Chelerytrine Chlorid, Hemmstoff der Proteinkinase C
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione-disodium, AMPA/Kainat-Rezeptor Blocker
CO_2	Kohlendioxid
DAG	Diacylglycerol
DHPG	(RS)-3,5-Dihydroxyphenylglycine, Agonist des mGlu-Rezeptor 1 und 5
DIV	Days in vitro
EPSPs	Exzitatorische postsynaptische Potentiale
ED 50	Effektivdosis 50, entspricht der Konzentration eines Pharmakons, bei welcher bei 50% der Versuche eine Wirkung nachzuweisen ist.
GABA	Gamma-amino-Buttersäure
Gs / Gi	Stimulatorisches G-Protein / inhibitorisches G-Protein
GDP	Guanosindiphosphat

gER	Glattes endoplasmatisches Retikulum
GFX	2-[1-(3-Dimethylaminopropyl)indol-3-yl]-3-(indol-3-yl)maleimide, Hemmstoff der Proteinkinase C
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hank`s balanced salt solution
IEGs	Immediate early genes
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IP3	Inositol-3-Phosphat
IP3-R	Inositol-3-Phosphat Rezeptor
LY 294002	2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one, Hemmstoff der Phosphatidylinositol-3-Kinase
MCPG	(RS)- α -Methyl-4-carboxyphenylglycine, Antagonist am mGlu-Rezeptor 1
MEM	Minimal essential medium
mGlu-Rezeptor	Metabotroper Glutamat-Rezeptor
MPEP	(2-Methyl-6-phenyl)pyridine hydrochloride), Antagonist am mGlu-Rezeptor 5
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NGF	Nerve growth factor
NGS	Normal goat serum
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NT-3,-4,-5	Neurotrophic factor -3, -4, -5
p7 / p8	Postnataler Tag 7 / 8
PB	Phosphatpuffer
PI3	Phosphatidylinositol-3

PIP2	Phosphatidylinositol-2-Phosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristate 13-acetate, Aktivator der Proteinkinase C
TTX	Tetrodotoxin, Natrium-Kanal-Blocker
U73122	1-[6-[[[(17b)-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17- yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione, Hemmstoff der Phospholipase C
Xest	Xestospongine C, Hemmstoff intrazellulärer IP3-Rezeptoren

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	4
1 ZUSAMMENFASSUNG	9
2 EINLEITUNG	10
2.1 PURKINJEZELLEN	11
2.1.1 <i>Anatomie und Entwicklung</i>	11
2.1.2 <i>Verschaltung und Funktion</i>	11
2.2 BISHERIGE ERKENNTNISSE ÜBER DIE DENDRITENENTWICKLUNG	14
2.2.1 <i>Allgemeines</i>	14
2.2.2 <i>Neuronale Aktivität und Dendritenentwicklung</i>	15
2.2.3 <i>Extrazelluläre Signale und Dendritenentwicklung</i>	16
2.2.4 <i>Die Rolle intrazellulärer Moleküle bei der Entwicklung von Dendriten</i>	18
2.3 GLUTAMATREZEPTOREN	20
2.3.1 <i>Verteilung von Glutamatrezeptoren im Kleinhirn</i>	21
2.3.2 <i>Metabotrope Glutamatrezeptoren</i>	21
2.4 SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE	22
2.4.1 <i>G-Protein gekoppelte Signaltransduktionswege</i>	23
2.4.2 <i>Signaltransduktion über die PI3-Kinase</i>	25
3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	26
4 MATERIAL UND METHODEN	27
4.1 MATERIAL	27
4.1.1 <i>Tiere</i>	27
4.1.2 <i>Versuchsreagentien und Pharmaka</i>	27
4.1.3 <i>Weitere Versuchmaterialien</i>	28
4.2 METHODEN	28
4.2.1 <i>Herstellung und Behandlung von Kleinhirnschnittkulturen</i>	28
4.2.2 <i>Immunzytochemische Färbung</i>	29
4.2.3 <i>Datenerhebung, quantitative und morphologische Analyse der Dendritenbäume</i>	29
4.2.4 <i>Statistische Auswertung</i>	30
4.2.5 <i>Versuchsreihen</i>	31
5 ERGEBNISSE	33

5.1	DENDRITENENTWICKLUNG VON PURKINJEZELLEN IN ORGANTYPISCHEN SCHNITTKULTUREN	33
5.2	MGLU-REZEPTOREN 1 UND DENDRITENENTWICKLUNG VON PURKINJEZELLEN	34
5.3	MGLU-REZEPTOR 1 UND PKC VERMITTELTE EFFEKTE	37
5.4	MGLU-REZEPTOR 1 VERMITTELTE EFFEKTE UND KÖRNERZELLEN	40
5.5	MGLU-REZEPTOR 1 - ASSOZIIERTE SIGNALWEGE UND PURKINJEZELL- DENDRITENENTWICKLUNG	43
6	DISKUSSION	47
6.1	PURKINJEZELLEN IN VITRO	47
6.2	EINFLUSS VON MGLU-REZEPTOREN AUF DIE DENDRITENENTWICKLUNG	49
6.2.1	<i>Spezifität der Rezeptoraktivierung</i>	49
6.2.2	<i>mGlu-Rezeptor1 und Dendritenentwicklung</i>	50
6.3	ZUSAMMENHANG MGLU-REZEPTOR UND PKC	51
6.4	KÖRNERZELLEFFEKT AUF PURKINJEZELLDENDRITENENTWICKLUNG	52
6.5	REZEPTORGEKOPPELTE SIGNALWEGE UND DENDRITENENTWICKLUNG	53
6.5.1	<i>Dendritenentwicklung und PLC</i>	53
6.5.2	<i>Dendritenentwicklung und PLC-unabhängige rezeptorassoziierte Signale</i>	53
7	SCHLUSSFOLGERUNG	57
8	LITERATURANGABEN	58
9	ANHANG	65
	DANKSAGUNG	65
	LEBENS LAUF	66
	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	68

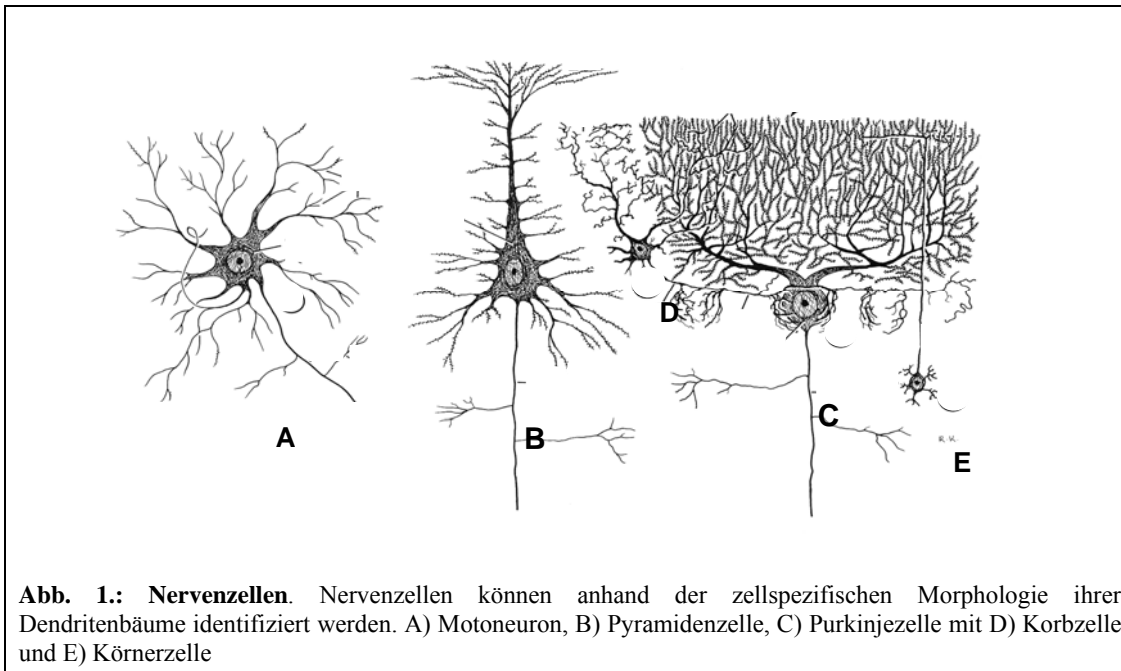
1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Dendritenentwicklung von Nervenzellen unterliegt geregelten Mechanismen. Die jeweilige Dendritenarchitektur ist für jede Nervenzellpopulation sehr spezifisch. Nervenzellen lassen sich anhand ihrer Dendritenbäume identifizieren und einer Zellpopulation zuordnen. Dass die Entwicklung solcher spezifischen Zellmerkmale geregelten Mechanismen unterliegt ist nahe liegend. Im Jahre 2000 konnten Metzger und Kapfhammer zeigen, dass eine Aktivierung der intrazellulären Proteinkinase C (PKC) in Purkinjezellen zu einer Hemmung des Dendritenwachstums dieser Zellpopulation in Kleinhirnschnittkulturen der Ratte führt. Auf Grund der Kenntnis des Signalwegs der Proteinkinase C im Paradigma der long term depression (LTD) wurde ein Zusammenhang von metabotropen Glutamaterezeptoren der Klasse 1 (mGlu-Rezeptoren 1) und der PKC Aktivierung vermutet.

Gegenstand dieser Arbeit sind Untersuchungen, welche die Wirkung einer Aktivierung von mGlu-Rezeptor 1 für die Dendritenentwicklung von Purkinjezellen in Kleinhirnschnittkulturen der Maus untersuchten und die darin involvierten Signalwege zu ermitteln versuchten. Als Versuchsmodell dienten organotypische Kleinhirnschnittkulturen von 7 bis 8 Tage alten Mäusen, die nach Präparation für 12 Tage inkubiert und pharmakologisch behandelt wurden. Dabei wurde eine Aktivierung von mGlu-Rezeptoren 1 mittels des spezifischen Agonisten DHPG vorgenommen. Die Aktivierung dieses Rezeptors führte zu einer Hemmung des Dendritenwachstums von Purkinjezellen und zeigte morphologische Ähnlichkeiten mit dem von Metzger und Kapfhammer (2000) beobachteten Effekt nach Aktivierung der PKC in Purkinjezellen. Ob die PKC in den Signalweg des mGlu-Rezeptor 1 Rezeptors für die Wirkung auf das Dendritenwachstum einbezogen ist konnte im Verlaufe dieser Untersuchungen nicht restlos geklärt werden. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass die Wirkung einer Aktivierung des mGlu-Rezeptor 1 auf die Dendritenentwicklung sich nicht beeinflussen lässt durch gleichzeitige Blockierung der klassischen Isoformen der PKC. Die gewonnenen Ergebnisse legen deshalb nahe, dass der mGlu-Rezeptor Effekt nicht ausschließlich über die Aktivierung der PKC vermittelt werden kann, sondern dass unterschiedliche Signalwege an der Transduktion des Rezeptoreffektes beteiligt sind. Erste Untersuchungen deuten darauf hin, dass beispielsweise auch der intrazelluläre IP3-Rezeptor an der Reaktion der Purkinjezellen beteiligt sein könnte.

2 EINLEITUNG

Die Dendritenarchitektur von Nervenzellen ist komplex, dynamisch und für jede Nervenzellart sehr spezifisch. So unterscheiden sich Nervenzellen in ihrer Dendritenmorphologie deutlich voneinander und lassen sich anhand dieser Strukturen einer Zellpopulation zuordnen. Der Dendritenbaum eines Motoneurons zeigt andere morphologische Charakteristika als der einer Pyramidenzelle und dieser unterscheidet sich wiederum deutlich von dem komplexen und verhältnismäßig großen Dendritenbaum einer Purkinjezelle im Kleinhirn (siehe Abb. 1).



Es ist nahe liegend, dass die Dendritenmorphologie der Nervenzellen feinen Regulationsmechanismen unterliegt, die die Zellarchitektur nahezu perfekt den zu erfüllenden Aufgaben und gegebenen Bedingungen anpasst. Die Untersuchung von möglichen rezeptorgesteuerten Regulationsmechanismen der Dendritenentwicklung von Purkinjezellen des Kleinhirns ist Gegenstand dieser Arbeit. Als Versuchsmodell dienten Kleinhirnschnittkulturen von sieben bis acht Tage alten Mäusen.

2.1 PURKINJEZELLEN

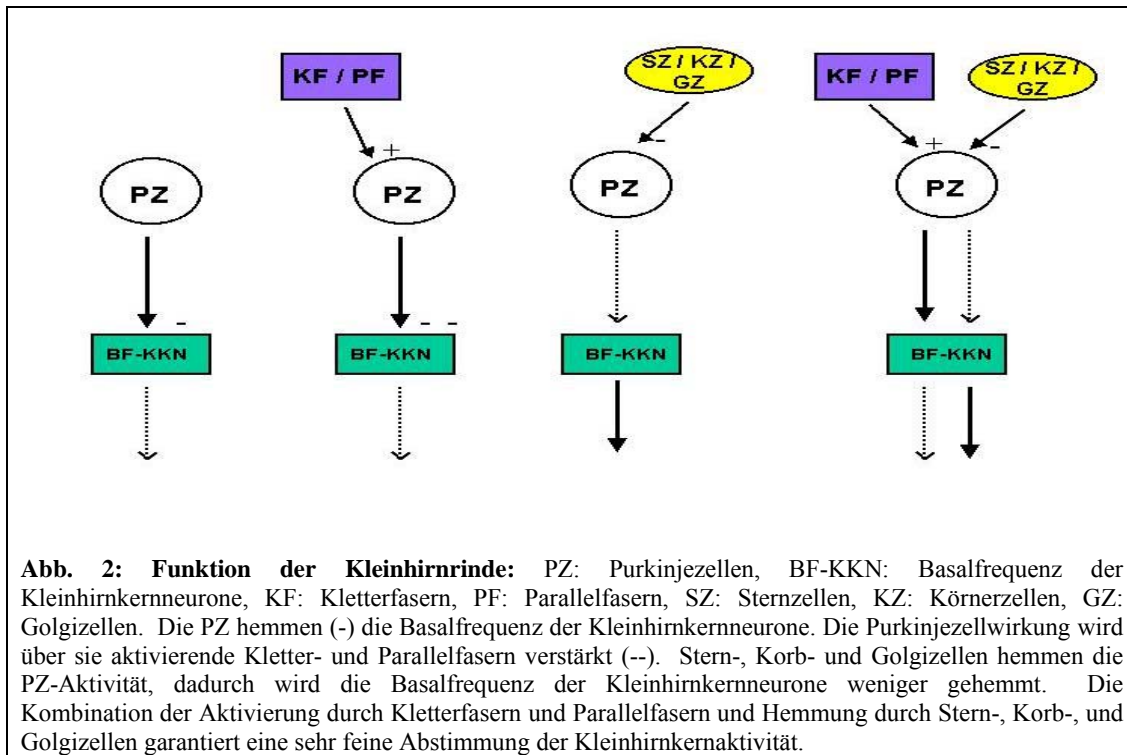
2.1.1 Anatomie und Entwicklung

Die Purkinjezellen sind die größten und einzigen efferenten Zellen des Kleinhirns. Ihre Somata befinden sich im Stratum purkinjense der Kleinhirnrinde. Sie projizieren mit ihrem Axon ins Marklager zu den dort liegenden Kleinhirnkernen, und breiten im Stratum molekulare der Kleinhirnrinde ihren reich verzweigten Dendritenbaum aus. Dieser imposante Dendritenbaum breitet sich fächerartig in einer Ebene aus die immer quer zur Längsachse der Kleinhirnwindungen verläuft. Man unterscheidet Dendriten erster, zweiter, dritter und höherer Ordnung. Die Dendriten dritter Ordnung sind dornenreich. Die Dendriten erster und zweiter Ordnung, sowie das Perikaryon besitzen glatte Oberflächen. An den Dendritenbäumen der Purkinjezellen enden tausende Afferenzen unterschiedlicher Zellen und Zellkomplexe (siehe Abb. 3). Die Purkinjezellen fungieren als Integrationseinheit dieser vielen Informationen, die der Koordination der Motorik und Abstimmung des Muskeltonus dienen (Ghez 1991).

Die Kleinhirnrinde enthält fünf verschiedene Neuronenpopulationen. Als Interneurone definierte Golgizellen, Sternzellen, Korbzellen und Körnerzellen und die efferenten Purkinjezellen. Die Interneurone entstehen relativ spät zwischen dem 19. Embryonaltag und 14. postnatalen Tag. Sie entstammen alle, mit Ausnahme der Golgizellen, der primitiven äußeren Körnerzellschicht, die um den 17. Embryonaltag erstmals in Erscheinung tritt (Altmann und Bayer 1978). Ungefähr um den 13. Embryonaltag kommt es zum ersten Auftreten von unreifen Purkinjezellen. Zunächst sind es unpolare Zellen mit wenig Fortsätzen, die in einer mehrreihigen Zellschicht liegen. Das Maximum ihrer Entstehung haben Purkinjezellen ungefähr um den 15. Embryonaltag (bei Ratten und Mäusen) (Bayer und Altmann 1995).

2.1.2 Verschaltung und Funktion

Purkinjezellen sind Integrationsstationen des Kleinhirns. Sie haben durch ihren Transmitter, GABA (Gamma-amino-Buttersäure), eine hemmende Wirkung auf die Neurone der Kleinhirnkernkerne. Durch eine Erregung über Parallelfasern oder Kletterfasern wird diese hemmende Wirkung verstärkt, die Korb-, Stern- und Golgizellen mindern diese hemmenden Einflüsse durch ihre eigene inhibitorische Wirkung auf Purkinjezellen. Purkinjezellen modulieren so die Aktivität der Kleinhirnkernneurone. Diese feuern Aktionspotentiale in einer hohen Basalfrequenz. Ein solches System der Inhibierung und Desinhibierung lässt eine feine Modulation der Aktivität der Kleinhirnkernkerne zu, wie sie etwa für die Feinabstimmung schneller Bewegungen benötigt wird (siehe Abb.2).

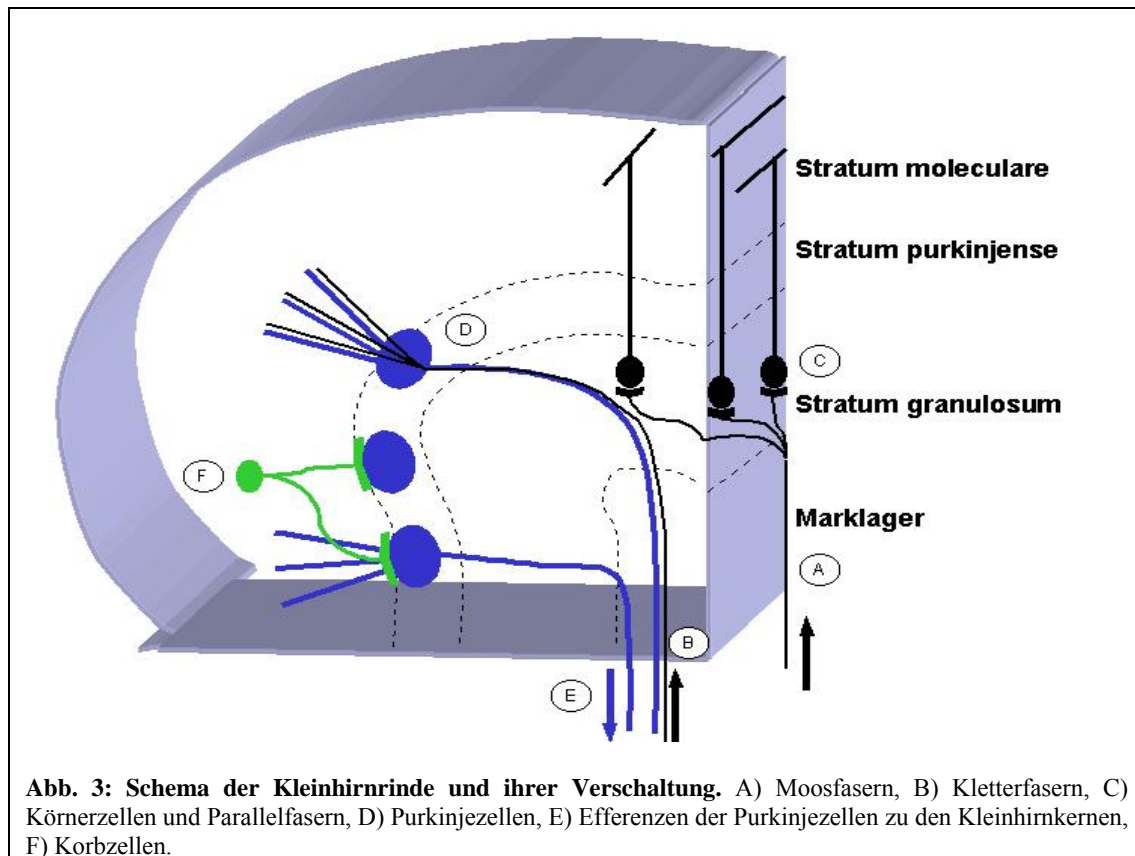


Da die Purkinjezelle eine sehr große Zahl von Afferenzen erhält, ist es nicht verwunderlich, dass die Afferenzen jeweils einer Zellpopulation an sehr charakteristischen Stellen der Purkinjezelloberfläche ihre Synapsen ausbilden.

An den dornenreichen Abschnitten der Dendriten höherer Ordnung befinden sich die Synapsen mit Parallelfasern. Parallelfasern sind t-förmig verzweigte, parallel zur Längsachse der Kleinhirnwindung verlaufende Axone der Körnerzellen. Sie bilden außerdem Synapsen mit Korb-, Stern- und Golgizellen, die als hemmende Interneurone im Stratum molekulare der Kleinhirnrinde lokalisiert sind. Die Körnerzellen selber erhalten ihre Afferenzen von Moosfasern aus dem Hirnstamm. Körnerzellen sind exzitatorische Zellen und verwenden als Transmitter die Aminosäure Glutamat (siehe Abb. 3). An der glatten Oberfläche der Purkinjezeldendriten erster und zweiter Ordnung enden die Neuriten von exzitatorischen Kletterfasern, sowie von Sternzellen. Kletterfasern sind markhaltige Fasern die aus dem unteren Olivenkern der Medulla oblongata entspringen. Ihr Transmitter ist ebenfalls die Aminosäure Glutamat. Sternzellen sind inhibitorisch wirkende Zellen. Ihr Transmitter ist Gamma-amino-Buttersäure (GABA). Sie erhalten ihre Afferenzen von Parallelfasern und von Kletterfaserkollateralen (Asanuma et al. 1983).

An den Perikarya der Purkinjezellen enden Kollateralen eigener Axone, Axone anderer Purkinjezellen sowie Axone der Korbzellen. Korbzellen sind inhibitorisch wirkende Zellen des Stratum molekulare der Kleinhirnrinde. Ihr Transmitter ist GABA. Sie bilden sowohl

axodendritische Synapsen mit den Dendriten der Purkinjezellen als auch ein dichtes Netzwerk von Axonkollateralen und Synapsen um das Purkinjezellperikaryon herum, daher ihr Name.



Zur Konvergenz der Informationsmenge benötigt die Purkinjezelle eine relativ große Fläche, über die sie Informationen empfangen kann. Die Größe ihres Dendritenbaumes ist unter Berücksichtigung dieses Aspekts und der streng zweidimensionalen Anordnung kaum verwunderlich. Es ist nahe liegend zu vermuten, dass die Entwicklung der Dendritenarchitektur der Purkinjezelle auch durch die sie aktivierenden und hemmenden Zellen beeinflusst werden kann. Diese aktivierenden oder hemmenden Einflüsse werden über verschiedene Rezeptoren und Signaltransduktionswege vermittelt, auf die im Weiteren näher eingegangen werden soll.

2.2 BISHERIGE ERKENNTNISSE ÜBER DIE DENDRITENENTWICKLUNG

2.2.1 Allgemeines

Der größte Teil der Entwicklung und Ausdifferenzierung des Dendritenbaumes von Purkinjezellen des Kleinhirns findet nach dem Auswachsen des Axons und während der Postnatalperiode statt. Die Entwicklung der Purkinjezellendendriten kann grob in zwei Phasen unterteilt werden. Zunächst kommt es in einer ersten Phase zum Auswachsen des Axons, welches in das Marklager des Kleinhirns zu den dort liegenden Kleinhirnkernen projiziert (Eisenmann et al. 1991). Kurz vor der Geburt kommt es dann zur Entstehung einer primären, noch unverzweigten Dendritenstruktur am anderen Pol der Zelle. Die Purkinjezelle ist nun im Stadium einer bipolaren Zelle. Diese Entwicklungsphase wurde von Ramon y Cajal (1926) auch als „fusiforme Phase“ beschrieben. In den ersten postnatalen Tagen verzweigt sich der Dendritenprozess zunehmend. Zusätzlich entstehen weitere Dendritenstrukturen an unterschiedlichsten Stellen des Zellkörpers so dass die Zellpolarität in dieser Phase zunächst wieder abnimmt. Auch ist das Wachstum der Dendritenbäume nicht so sehr von einer Größenzunahme und Verzweigung der primären Dendritenstrukturen gekennzeichnet, sondern vielmehr durch ein starkes Remodeling dieser Strukturen mit Rückbildung der apikalen Dendriten und dem Auswachsen neuer Prozesse, an anderer Stelle. Charakteristisch ist das Auftreten so genannter Filopodien. Filopodien sind dynamische Strukturen, die mit hoher Frequenz auftreten und wieder verschwinden. Einige können sich zu reifen Dendriten entwickeln. Reife Dendritenbäume zeichnen sich durch eine weitgehend stabile Struktur aus. Aus diesem Grund nimmt auch die Dynamik der Filopodien mit zunehmender Reifung der Dendritenbäume ab (Dailey und Smith 1996, Fiala et al. 1998).

Diese erste Phase dauert etwa bis Ende der ersten postnatalen Woche. Während dieser Zeit ordnen sich die Zellen auch als einreihige Zellschicht an (Ramon y Cajal 1911). Die Hauptafferenzen erhält die Purkinjezelle währenddessen von Kletterfasern die im Bereich des Perikaryons Synapsen mit der Purkinjezelle ausbilden (Mason et al. 1990). Parallelfasern entwickeln sich erst während dieser ersten postnatalen Woche und es existieren lediglich einige unreife Synapsen zwischen Parallelfasern und Purkinjezellen (Altmann und Anderson 1972). Interessanterweise stehen zu diesem Zeitpunkt noch mehrere Kletterfasern mit einer Purkinjezelle in synaptischem Kontakt. Im späteren Verlauf der Entwicklung kommt es zur Elimination dieser multiplen Kletterfaserinnervation. Die Geschwindigkeit und Dynamik des Dendritenwachstums in dieser initialen Phase ist langsam, nimmt im Verlauf der Entwicklung zu, um dann mit zunehmender Reifung der Dendritenbäume wieder abzunehmen (Koester und O'Leary 1992, Ramon y Cajal 1911).

In der zweiten Phase der Dendritenentwicklung von Purkinjezellen des Kleinhirns kommt es zur endgültigen Ausdifferenzierung und Wachstum des Dendritenbaumes. Dieser Prozess beginnt nach Ende der ersten postnatalen Woche. Zunächst kommt es zur Ausbildung eines Wachstumshügels am gegenüberliegenden Pol zum Abgang des Axons vom Zellkörper. Von diesem Wachstumshügel aus entwickeln sich ein bis zwei primäre Dendriten die rasch an Größe zunehmen und sich vielfach verzweigen. Die Verzweigung resultiert in der Entstehung von Dendriten zweiter und höherer Ordnung (Altmann 1972). Während dieser Entwicklungsphase bilden sich auch die Synapsen von Parallelfasern und Purkinjezellen aus, welche sogleich die Hauptafferenzen dieses Stadiums darstellen (Altmann 1972). Im Verlaufe der Entwicklung wandern nun auch die Kletterfasersynapsen an ihre definitive Lokalisation an den Dendriten erster und zweiter Ordnung. Diese zweite Entwicklungsphase überspannt den Zeitraum zwischen Ende der ersten und Ende der vierten postnatalen Woche. Es kommt zur stetigen Zunahme der Dendritengröße und Verzweigung, sowie zur definitiven Ausrichtung der Dendritenbäume und zur Ausbildung einer großen Zahl von Parallelfaser-Purkinjezell-Synapsen (Ramon y Cajal 1911). Diese Synapsen entstehen hauptsächlich an den dornenreichen Abschnitten der Dendriten höherer Ordnungen. Dornen treten vermehrt in der letzten Phase der Dendritenentwicklung auf. Es sind, ähnlich wie Filopodien, sehr dynamische Strukturen (Matus und Dunaevsky 1999). Stellen Filopodien primitive Formen von Dendritenverzweigungen dar so können Dornen als Frühformen einer Synapse verstanden werden (Harris 1999).

2.2.2 Neuronale Aktivität und Dendritenentwicklung

Neuronale Aktivität spielt bei der Entwicklung von Dendriten eine wichtige Rolle. Reduktion oder Aufhebung afferenter Aktivität führt häufig zur Verkümmern und zum Verschwinden von Dendriten (Rakic und Sidman 1973, Rakic 1975, Sotelo et al. 1975, Kalb et al. 1994, Vogel und Prittie 1995, Mason et al. 1997). Diese Effekte können lokal begrenzt auftreten und geschehen sehr schnell. Die Atrophie von Dendriten nach Aufhebung afferenter Impulse kann innerhalb nur einer Stunde stattfinden (Benes et al. 1977, Deitch und Rubel 1984). Die Verzweigung und Größe von Dendriten nimmt in einem Umfeld mit reichhaltigen afferenten Impulsen zu. Eine interessante Beobachtung ist jedoch, dass es auch in Gegenwart des Natriumkanalblockers Tetrodotoxin (TTX), der zu einer Unterdrückung aller natriumabhängigen Aktionspotentiale führt, zu keiner deutlichen Veränderung der Dendritenbäume im Vergleich zu Kontrollgruppen kommt. Es ist denkbar, dass dieser Effekt auf der Freisetzung des exzitatorischen Transmitters Glutamat durch so genannte miniature postsynaptic potentials begründet ist, die auch bei Fehlen von Aktionspotentialen erfolgt. Glutamat kann die Entwicklung und Verzweigung von Dendritenbäumen auch in Gegenwart von TTX positiv beeinflussen (McAllister und Katz

1996, McKinney et al. 1999). Es konnte festgestellt werden, dass spezifische Erregungsmuster die Dendritenentwicklung und insbesondere das Richtungswachstum beeinflussen können. Denkbar ist, dass es für die Dendritenentwicklung von Bedeutung ist möglichst viele funktionell wichtige, afferente Impulse zu empfangen. An Hippokampusschnittkulturen konnte gezeigt werden dass Langzeitpotenzierung eine vermehrte Bildung neuer Dornen zur Folge hat (Engert und Bonhoeffer 1999). Diese Erkenntnisse führten zur Formulierung der „Synaptotropic hypothesis of dendritic growth“. Sie besagt, dass Dendritenverzweigungen an Stellen mit synaptischem Kontakt entstehen und durch Synapsen stabilisiert werden. Verzweigungen mit geschwächten Synapsen werden sich zurückentwickeln oder vollständig verschwinden (Vaughn 1989).

Speziell für Purkinjezellen wurden eine Reihe interessanter Versuche durchgeführt in denen eine ihrer Hauptafferenzen, die Körnerzellen, eliminiert wurden um deren Effekt auf die Dendritenentwicklung besser zu verstehen. Eine Elimination der Körnerzellen und anderer Interneurone des Kleinhirns durch pränatale Radiatio eliminierte nahezu 90% der Purkinjezellafferenzen (Schmidt 1962). Es zeigte sich, dass Purkinjezellen hierunter die Ausrichtungsorientierung ihrer Dendritenbäume verlieren und sich eher zufällig im Raum anordnen. Dendriten dritter oder höherer Ordnung fehlen vollständig (Altmann und Anderson 1972). In *weaver*-Mutanten, deren Körnerzellen absterben bevor sie mit Purkinjezellen synaptische Kontakte ausbilden, zeigte sich ebenfalls eine Reduzierung von Dendriten dritter und höherer Ordnung. In beiden Versuchsreihen entwickeln die Purkinjezellen jedoch sehr charakteristische Dendritenbäume. Parallelfaserinnervation scheint daher zur Ausbildung eines hochdifferenzierten Dendritenbaumes und zur Orientierung desselben in der Sagittalebene notwendig zu sein. Einfache, purkinjezell-spezifische Dendritenbäume können jedoch auch ohne Parallelfaserinnervation entstehen. Die Hemmung ionotroper und metabotroper Glutamatrezeptoren an Purkinjezellen und die darüber verursachte verminderte Exzitation via Parallelfasern zeigte keinen Effekt auf die Dendritenentwicklung von Purkinjezellen in Kleinhirnschnittkulturen (Adcock et al. 2004).

2.2.3 Extrazelluläre Signale und Dendritenentwicklung

Es existiert eine Vielzahl extrazellulärer Signale, welche die Dendritenentwicklung beeinflussen können. Besonderes Augenmerk fällt auf die Neurotrophine (Nerve growth factor (NGF), brain derived neurotrophic factor (BDNF), Neurotrophin 3,4,5 (NT-3,4,5)) und deren Rezeptoren. Diese werden im sich entwickelnden Nervensystem stark exprimiert (McAllister und Katz 1999). Ihre Einflussnahme auf die Dendritenentwicklung ist mannigfaltig und soll nicht in allen Einzelheiten besprochen werden. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass jede Entwicklungsbeeinflussung durch Neurotrophine sich durch eine für sie jeweils spezifische Veränderungen an den Dendriten auszeichnet. Zum Beispiel

entwickeln Pyramidenzellneurone, die verstärkt BDNF ausgesetzt sind, vermehrt Dendriten niedrigerer Generationen und vermindern ihre Anzahl an Spines (Horch et al. 1999). Diese Beobachtung führte einige Autoren zu der Annahme, dass BDNF für die Erzeugung struktureller Instabilitäten verantwortlich sei. Diese Instabilität ist Voraussetzung für die strukturelle Dynamik im Prozess der Dendritenentwicklung (Horch et al. 1999). Speziell für Purkinjezellen des Kleinhirns existieren unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich des Effektes von BDNF auf die Entwicklung ihrer Dendriten. In BDNF -/- Mäusen fanden sich deutlich unterentwickelte Dendritenbäume (Segal et al. 1995, Schwartz et al. 1997). In Zellkulturmodellen hat die Erhöhung der BDNF-Konzentration im Kleinhirn postnatal jedoch keinen starken Effekt auf die Dendritenentwicklung von Purkinjezellen. Es wurde lediglich eine vermehrte Bildung von Spines beobachtet (Morrison und Mason 1998, Shimada et al. 1998, Kapfhammer 2004). Neuere Untersuchungen an Mäusen ohne funktionellen BDNF-Rezeptor bestätigen die Auffassung, dass die Dendritenentwicklung der Purkinjezellen in Abwesenheit von BDNF-Signalen weitgehend normal verläuft (Rico et al. 2002). Eine positive Wirkung auf das Überleben von Purkinjezellen in vitro konnte nach Gabe von NGF in Kombination mit Agonisten für mGlu-Rezeptoren oder Acetylcholin-Rezeptoren festgestellt werden (Mount et al. 1994). Ähnliche Effekte hatten auch IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) und NT-3 (Torres-Alemann et al. 1992, Larkfos et al. 1996).

Welche Wirkungen Neurotrophine auf intrazelluläre Prozesse ausüben und welche Rolle diese Substanzen bei der Entwicklung von Purkinjezelldendriten in vivo haben ist nicht vollständig geklärt. Zwei Wirkmechanismen kommen dabei in Betracht. Neurotrophine könnten eine direkte Wirkung auf das Zytoskelett ausüben und strukturelle Veränderungen im Dendritenbaum hervorrufen, oder sie könnten indirekt Transkription und Translation in Nervenzellen beeinflussen.

Viele Hormone zeigen Wirkungen auf die Entwicklung von Dendriten. Thyroidhormone können beispielsweise die Dendritenentwicklung fördern (Nicholson und Altman 1972). Es ist bekannt, dass ein unbehandelter, angeborener Hypothyreoidismus mit ausgeprägten Entwicklungspathologien im Zentralnervensystem einhergeht. Purkinjezelldendriten von hypothyreoten Ratten zeigten eine Reduktion ihrer Größe und Verzweigung (Nicholson und Altmann 1972, Lauder et al. 1978, Vincent et al. 1983). Interessanterweise treten diese phänotypischen Veränderungen lediglich auf, wenn Thyroidrezeptoren nicht in der Lage sind Liganden zu binden (Hashimoto et al. 2001). Das vollständige Fehlen dieser Rezeptoren geht nicht mit einem pathologischen Phänotyp des Zentralnervensystem einher (Göthe et al. 1999).

Erst kürzlich konnte in einigen Untersuchungen gezeigt werden, dass Purkinjezellen in der frühen perinatalen Zeit sowohl Progesteron als auch Östrogen sezernieren (Sahamoto et al. 2003, Tsutsui et al. 2003). Sowohl Progesteron als auch Östrogen stimulieren das Dendritenwachstum von Purkinjezellen und können die Dichte von Dornen an den Dendriten verstärken. Diese Effekte sind durch die jeweiligen Rezeptorantagonisten blockierbar und können daher als spezifische Effekte der Hormone verstanden werden (Sahamoto et al. 2003).

2.2.4 Die Rolle intrazellulärer Moleküle bei der Entwicklung von Dendriten

Viele intrazelluläre Moleküle und Zellbestandteile sind an der Entwicklung von Dendritenbäumen beteiligt. Häufig sind sie Effektorsysteme bestimmter Signalwege. Beteiligte Effektorsysteme können Zellorganellen, wie zum Beispiel Ribosomen und deren mRNA, Bestandteile des Zytoskeletts und dessen Regulatoren sowie verschiedene Gene und Enzyme sein. Sehr häufig kommt es zur Aktivierung von Proteinkinasen, die als Teil von Signaltransduktionskaskaden Einfluss auf die genannten Effektorsysteme nehmen. In der Vergangenheit konnte die Beteiligung einiger kleiner GTPasen nachgewiesen werden. Sie gelten als effektive Regulatoren der Signaltransduktion im Bereich von Zytoskelettfunktionen und regulieren das Dendritenwachstum in mehreren Regionen des Zentralnervensystems (Threadgill et al. 1997, Li et al. 2000). Es konnte festgestellt werden, dass die so genannten IEGs (immediate early genes), welche in Gegenwart von Wachstumsfaktoren verstärkt exprimiert werden, an der Dendritenentwicklung beteiligt sein können. Es gibt eine Reihe weiterer Gene die als Stopp- oder Initiationssignale fungieren können (McAllister 2000). Besonderes Augenmerk möchte ich in diesem Abschnitt auf die Proteinkinasen und insbesondere auf die Proteinkinase C (PKC) legen, die in Purkinjezellen ein Effektorsystem der mGlu-Rezeptoren bilden.

2.2.4.1 Proteinkinasen und ihr Einfluss auf die Dendritenentwicklung

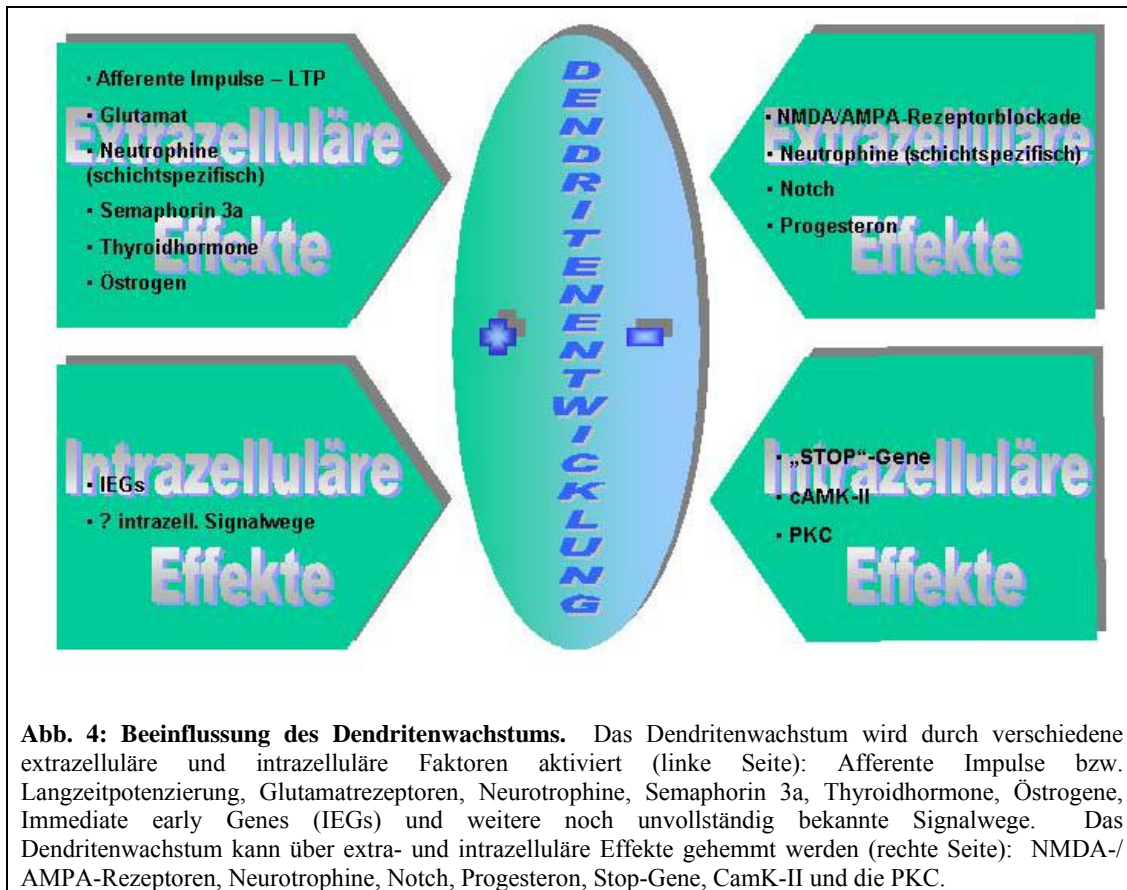
Es ist bekannt, dass die Kalzium/Kalmodulin-abhängige Proteinkinase II (CamKII) ein wichtiger Faktor bei der Regulierung der Plastizität von Synapsen und Dendriten ist. Sie kann als eine Art Stopp-Signal fungieren und unreife, instabile Synapsen in die stabilere, reife Form überführen (Wu und Cline 1998, Zou und Cline 1999).

Eine weitere, im Zentralnervensystem weit verbreitete Proteinkinase, ist die Proteinkinase C (PKC). Die Aktivität der PKC wird hauptsächlich über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren reguliert. Im Bereich des Nervensystems zum Beispiel durch metabotrope Glutamat-Rezeptoren der Gruppe 1. Es gibt viele verschiedene Isoformen der PKC, die grob in drei Kategorien unterteilt werden können. In Kalzium-abhängige Formen (α , β I, β II, γ), die von Phosphatidylserin und Diacylglycerol (DAG) aktiviert werden können, in Kalzium-

unabhängige Formen (δ , ε , η , θ) die nur von DAG aktiviert werden und atypische Formen (ζ , λ) die sowohl für Kalzium als auch für DAG unsensibel sind. In Purkinjezellen wurde das Vorkommen von PKC α , γ , δ und ζ (letztere in niedriger Konzentration) beschrieben. Die Expression der jeweiligen Formen variiert innerhalb der Entwicklung. Generell ist zu sagen, dass der Gehalt an Kalzium-abhängigen Formen im Laufe der Entwicklung parallel zur Zunahme synaptischer Kontakte steigt.

PKCs aktivieren viele intrazelluläre und membranassoziierte Proteine, die mit neuronaler Plastizität in Verbindung stehen. Ihre Aktivität spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Elimination der multiplen Kletterfaserinnervation von Purkinjezellen. Hierbei wird ihr Effekt über mGlu-Rezeptoren 1 vermittelt. Der an diese Rezeptoren gekoppelte, bekannte Signalweg führt zur Aktivierung der PKC. Die Aktivierung der PKC spielt außerdem bei der LTD an Parallelfaser-Purkinjezell-Synapsen eine wichtige Rolle (Hashimoto et al. 2000, Ichise et al. 2000). Über die Aktivierung der PKC kommt es zur Phosphorylierung der AMPA-Rezeptoren an Purkinjezelldendriten und damit zur Reduktion exzitatorischer Impulse (Hirai 2001). Die Hemmung der PKC führt zum Verlust der LTD (Goossens et al. 2001). LTD spielt eine wichtige Rolle bei der synaptischen Plastizität im Cerebellum.

Eine pharmakologisch chronische Aktivierung der PKC führt auch zu einer Abnahme der Größe und der Verzweigung der Dendritenbäume. Dieser Effekt ist reversibel. Die Dendritenbäume erholen sich in vitro nach Abbruch der Behandlung innerhalb von sechs Tagen (Metzger und Kapfhammer 2000). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Inhibierung kalziumabhängiger PKCs zu einer Zunahme der Verzweigung der Dendritenbäume führt. Es wurde zunächst angenommen, dass vornehmlich die PKC γ an der Dendritenentwicklung beteiligt ist. PKC Aktivierung in PKC γ -defizienten Tieren zeigte aber weiterhin einen verkleinernden Effekt auf die Dendriten (Schrenk et al. 2002). Diese Beobachtungen legen nahe, dass nicht nur die PKC γ an der Beeinflussung des Dendritenwachstums beteiligt ist (Metzger und Kapfhammer 2003). Es stellt sich die Frage über welche Mechanismen die Aktivität der PKC moduliert wird und welche weitere Funktion diese bei der Dendritenentwicklung von Purkinjezellen des Kleinhirns spielen. Eine Zusammenfassung der extra- und intrazellulären Einflüsse auf die Dendritenentwicklung findet sich in Abb. 4.



2.3 GLUTAMATREZEPTOREN

Die dieser Arbeit zu Grunde liegende Hypothese geht von der Beteiligung rezeptorgekoppelter Signalwege an der Dendritenentwicklung von Purkinjezellen aus. Ein an Purkinjezellen stark exprimierter Rezeptor, der seine Wirkung über eine Signaltransduktionskaskade vermittelt, ist der metabotrope Glutamat-Rezeptor (mGlu-Rezeptor). Auf diesen soll im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden. Wie bereits erwähnt nimmt er über einen bekannten Signalweg auch an der Aktivierung der PKC teil.

Glutamat ist im Zentralnervensystem ein weit verbreiteter exzitatorischer Transmitter der seine Wirkungen über eine Reihe unterschiedlicher Glutamatrezeptoren entfalten kann. Man unterscheidet zwischen ionotropen, rezeptorgekoppelten Ionenkanälen, und metabotropen, G-Protein gekoppelten Glutamatrezeptoren. Ionotrope Rezeptoren entfalten ihre Wirkung direkt durch Öffnung von Ionenkanälen nach Bindung des Liganden an die Rezeptorbindungsstelle. Zu ihrer Familie rechnet man die NMDA, AMPA (benannt nach deren spezifischen Rezeptoragonisten, N-methyl-D-aspartat, α -amino-3-hydroxy-5-

methyl-1-4-isoxazylpropionat) und Kainat-Rezeptoren. Metabotrope Rezeptoren entfalten ihre Wirkung indirekt, mittels zweiter Botenstoffe (second messenger) über Signaltransduktionskaskaden (Ozawa et al. 1998).

2.3.1 Verteilung von Glutamatrezeptoren im Kleinhirn

Die Verschaltung der Kleinhirnrinde lässt Rückschlüsse auf die Verteilung von Glutamatrezeptoren an den Kleinhirnrindenneuronen zu. Die Purkinjezellen empfangen eine große Zahl exzitatorischer Impulse über Parallelfasern der Körnerzellen und Kletterfasern. Diese exzitatorischen Impulse werden hauptsächlich über rezeptorgekoppelte Ionenkanäle vermittelt. Dazu gehören die NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren. Für motorisches Lernen ist das bereits erwähnte Prinzip der long term depression (LTD) von großer Bedeutung, für die LTD wiederum ist der Signalweg über mGlu-Rezeptoren entscheidend. An der Oberfläche der Purkinjezellen finden sich deshalb neben ionotropen Glu-Rezeptoren also auch mGlu-Rezeptoren (Ozawa et al. 1998, Knöpfel und Grandes 2002). Dabei ist der mGlu-Rezeptor 1 bereits vor Beginn der afferenten Innervation an der Oberfläche unreifer Purkinjezellen nachweisbar (Lopez-Bendito et al. 2001).

Hinsichtlich der zu Grunde liegenden Fragestellung soll auf die ionotropen Glutamatrezeptoren an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden. Allerdings sei zu erwähnen, dass AMPA-Rezeptoren die wichtigsten ionotropen Rezeptoren in der Parallelfaser-Purkinjezellsynapse darstellen.

2.3.2 Metabotrope Glutamatrezeptoren

2.3.2.1 Klassifizierung metabotroper Glutamatrezeptoren

Metabotrope Glutamatrezeptoren (mGlu-Rezeptoren) gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. G-Proteine sind an der Membraninnenseite gelegene Proteine, die an der Signalverarbeitung und -vermittlung beteiligt sind. Bis heute wurden acht verschiedene, verwandte Gene isoliert, die acht mGlu-Rezeptoren kodieren (Abe et al. 1992). Die unterschiedlichen mGlu-Rezeptoren (1-8) weisen starke Ähnlichkeiten in ihrer Primärstruktur auf. Ihre Aminosäuresequenz zeigt mehr als 40% Übereinstimmung. Auf der Basis ihrer Aminosäurehomologie können die mGlu-Rezeptoren in drei Untergruppen eingeteilt werden, die jeweils 70% ihrer Aminosäuresequenz teilen. Die drei Untergruppen, Gruppe I-III, zeigen Übereinstimmungen in Bezug auf Pharmakologie und rezeptorabhängige Signaltransduktionswege (Pin und Duvoisin 1995).

2.3.2.2 *Molekularbiologische Aspekte*

Metabotrope Glutamatrezeptoren sind große Proteine mit einer Länge von 854 bis zu 1179 Aminosäuren. Ihre Tertiärstruktur ist gekennzeichnet durch sieben Transmembrandomänen mit relativ großem extrazellulären Anteil. Sie zeigen jedoch geringe bis gar keine Sequenzhomologien mit anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Es wurde empfohlen, die mGlu-Rezeptoren als eigenständige Familie unter den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu betrachten (Nakanishi 1992, Hollmann und Heinemann 1994, Pin und Duvoisin 1995). Die molekulare Struktur der mGlu-Rezeptoren zeichnet sich durch eine lange und extrazellulär gelegene N-terminale Region aus, in deren Bereich die Glutamat Bindungsstelle zu erwarten ist. Der N-terminalen Region folgen die sieben Transmembrandomänen. Die Sequenz der ersten und dritten intrazellulären Schleife ist bei allen mGlu-Rezeptoren stark konserviert und scheint eine Rolle bei der Bindung und Aktivierung der G-Proteine zu spielen. Den sieben Transmembrandomänen folgt eine intrazellulär gelegene C-terminale Region. Sie variiert, abhängig von den Rezeptorsubtypen, in ihrer Länge. Diese könnte eine Rolle bei der Wirkstärke des Agonisten spielen (Ozawa et al. 1998). Metabotrope Glu-Rezeptoren üben ihre Wirkung über zweite Botenstoffe auf nachgeschaltete Effektorsystem aus. Dabei kommt es über die Beeinflussung von Kanalproteinen typischerweise zu einer Veränderung des Membranpotentials und zum Auftreten postsynaptischer Potentiale. Diese haben typischerweise eine höhere Latenz und eine geringere Amplitude als die von ionotropen Rezeptoren getragenen Potentiale und Ströme. Neben der Beteiligung an der elektrischen postsynaptischen Reaktion haben sie aber auch Einfluss auf viele Zellfunktionen, wie zum Beispiel die Proteinsynthese, die Aktivierung bestimmter Stoffwechselwege oder die Aktivierung des Zellzyklus.

2.4 *SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE*

Wie im vorhergehenden Abschnitt bereits erwähnt, vermitteln mGlu-Rezeptoren ihre Informationen über G-Protein gekoppelte Signalwege an spezifische Effektorsysteme im Zellinneren. Von einer Beteiligung dieser rezeptorgekoppelten Signalwege bei der Dendritenentwicklung von Purkinjezellen wird in der zu Grunde liegenden Hypothese ausgegangen.

2.4.1 G-Protein gekoppelte Signaltransduktionswege

2.4.1.1 G-Proteine

G-Proteine sind an der Membraninnenseite gelegene Proteine, die aus drei Untereinheiten bestehen. Sie binden Guaninnukleotide, die in Abhängigkeit des Funktionszustandes unterschiedlich phosphoryliert sind. Sie kommen an unterschiedlichen Rezeptortypen vor, unter anderem an adrenergen und cholinergen Rezeptoren, an GABA-B und an metabotropen Glutamatrezeptoren. In der Familie der G-Proteine sind bisher mehr als zwanzig verschiedene Typen charakterisiert. Sehr grob können stimulierende G-Proteine (Gs) von inhibitorisch wirkenden G-Proteinen (Gi) unterschieden werden. Alle diese G-Proteine haben eine nahezu identische Funktionsweise. Sie bestehen aus drei Untereinheiten: der α , β und γ -Untereinheit. In der inaktiven Form bindet die α -Untereinheit ein Molekül Guanosindiphosphat (GDP). Wird der zugehörige Rezeptor aktiviert, wird das gebundene GDP durch ein Molekül Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht und das Protein dadurch in seinen funktionsfähigen Zustand überführt. Die α -Untereinheit dissoziiert anschließend von der fester an den Rezeptor gebundenen β/γ -Untereinheit und kann an der Membraninnenseite gelegene Effektorproteine beeinflussen (zum Beispiel die Adenylatcyclase oder die Phospholipase C). Je nach Art des G-Proteins wirkt es entweder aktivierend oder inhibierend. Die α -Untereinheit besitzt eine eigene katalytische Funktion, die durch Dephosphorylierung GTP in GDP umwandelt und das Protein wieder in seinen inaktiven Zustand überführt. Daraufhin verbindet es sich erneut mit der β/γ -Untereinheit.

Die den G-Proteinen direkt nachgeschalteten Enzyme produzieren zweite Botenstoffe (gasförmige: NO, CO; nichtgasförmige: IP₃, cAMP) die ihrerseits bestimmte Effektorsysteme regulieren und Signaltransduktionskaskaden in Gang setzen. Effektorsysteme sind häufig Proteinkinasen (übertragen Phosphatreste auf Proteine und Enzyme und ändern dadurch deren biologische Aktivität) oder Ca²⁺, das als Botenstoff aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird. G-Proteine können auch direkt den Funktionszustand von Ionenkanälen beeinflussen (an muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren aktiviert die β/γ -Untereinheit einen Kalium-Kanal).

2.4.1.2 Signalwege

G-Proteine können eine membrangebundene Adenylatcyclase aktivieren, die aus Adenosintriphosphat (ATP) zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) herstellt. cAMP aktiviert als zweiter Botenstoff die Proteinkinase A, die Einfluss auf viele Zellfunktionen ausübt. Die Aktivität der Adenylatcyclase kann auch durch inhibitorische G-Proteine beeinflusst werden.

Ein weiterer Signalweg läuft über die Aktivierung der ebenfalls membrangebundenen Phospholipase C (PLC) (s. Abb. 5). Dabei werden zwei second messenger erzeugt, die sowohl abhängig als auch unabhängig voneinander agieren können. Die PLC stellt aus dem Membranphospholipid Phosphatidylinositol-2-Phosphat (PIP₂) Inositol-3-Phosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) her. DAG ist fettlöslich und verbleibt als Botenstoff in der Membran. IP₃ dagegen ist wasserlöslich und diffundiert ins Zytoplasma. Hier existieren an membranösen Zellorganellen, insbesondere dem glatten endoplasmatischen Retikulum (gER), IP₃ Rezeptoren an die der Botenstoff bindet. Am gER ist dieser Rezeptor an einen Kalzium-Kanal gekoppelt, der durch die Bindung von IP₃ zur Freisetzung großer Mengen intrazellulär gespeicherten Kalziums führt. Kalzium kann nun als Botenstoff weiteren Einfluss auf Zellfunktionen nehmen. DAG aktiviert (teilweise in Gegenwart von Kalzium) die Proteinkinase C die, wie bereits die PKA, durch die Phosphorylierung bestimmter Proteine Zellfunktionen beeinflusst.

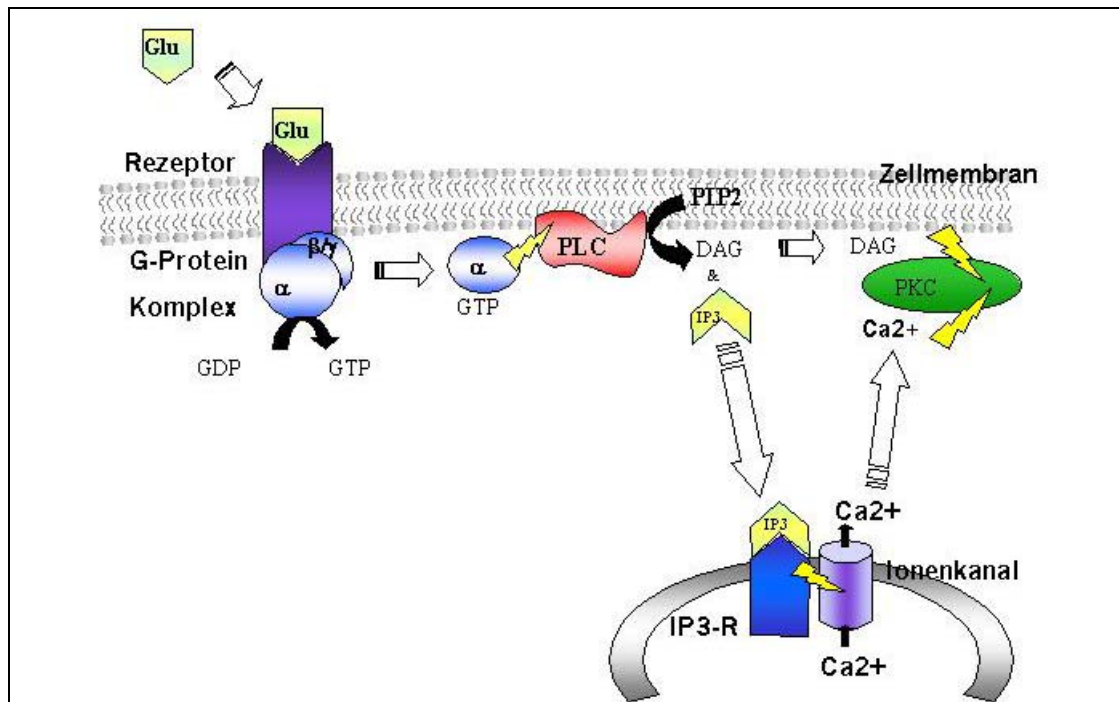
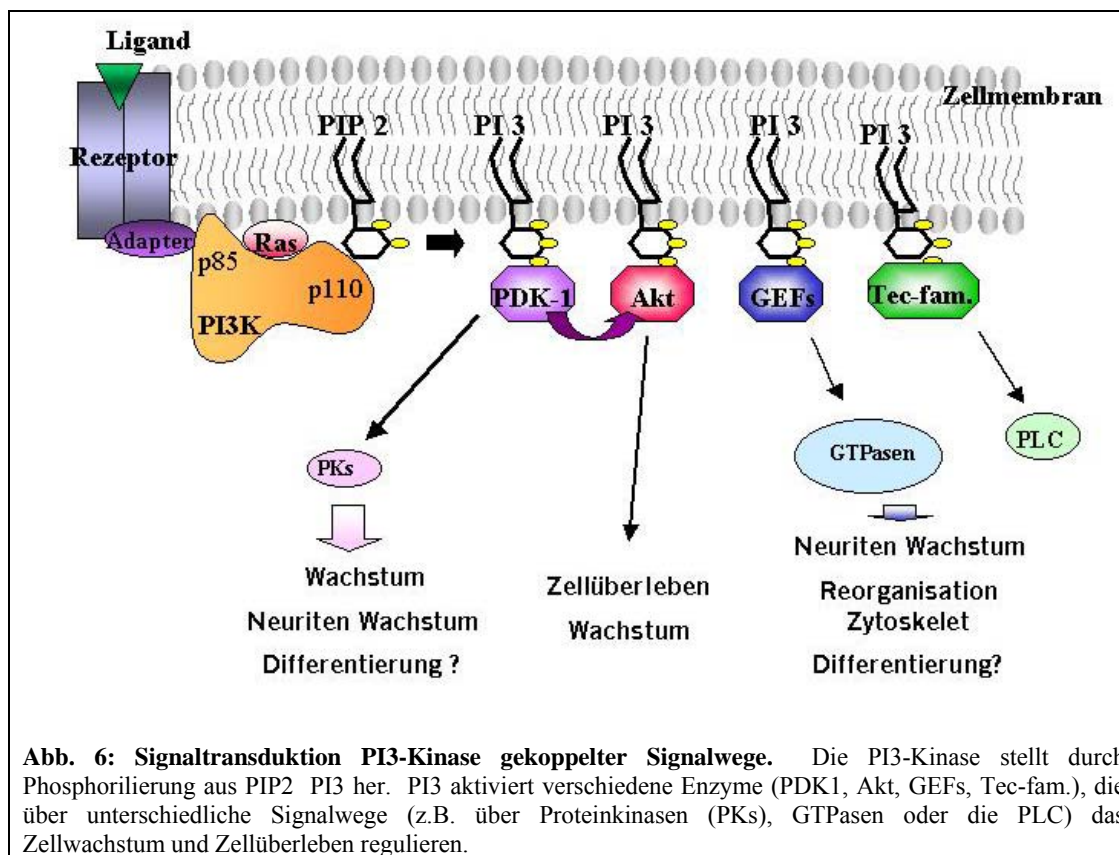


Abb. 5: Signaltransduktionskaskade der PKC Aktivierung durch Glu-Rezeptor Stimulation. Aktivierung des mGlu-Rezeptors führt zum Austausch von GDP zu GTP an der α-Untereinheit des G-Proteins. Die so aktivierte Untereinheit dissoziiert vom Rezeptorkomplex und aktiviert die PLC. Diese spaltet das membrangebundene PIP₂ in DAG und IP₃ welches an intrazellulär gelegene IP₃ Rezeptoren (IP₃-R) bindet. Durch die Aktivierung von IP₃ an intrazellulären Kalziumspeichern kommt es zur Entleerung dieser Speicher. Kalzium in Kombination mit DAG aktiviert die Proteinkinase C.

2.4.2 Signaltransduktion über die PI3-Kinase

Ein Signalweg der bisher größere Bedeutung im Rahmen der Tyrosinkinaserzeptor vermittelten Signalwege gefunden hat, soll, da er im Rahmen dieser Arbeit eine Rolle spielt, im Folgenden kurz besprochen werden. Die Phosphatidyl-inositol-3-Kinase (PI3-Kinase) stellt aus PIP₂ durch Phosphorylierung Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI₃) her, welches sich von IP₃ durch Phosphorylierung an 3`Stelle anstatt 1`Stelle des Inositolrings unterscheidet. PI₃ ist ein second messenger, der als Regulator verschiedener Enzyme dient. Unter anderem nimmt er Einfluss auf die PLC, auf Zellzyklusregulationen, Proteinsynthese und andere Signalwege. Außerdem können auf diesem Weg bestimmte Unterformen der PKC aktiviert werden (s. Abb. 6). Die Aktivierung der PI3-Kinase ist hauptsächlich im Zusammenhang mit Tyrosinkinaserzeptoren untersucht worden. Eine Aktivierung über G-Proteingekoppelte Rezeptoren ist jedoch auch denkbar (Cantrell 2001, Cantley 2002, Rogers und Theibert 2002).



Signaltransduktionskaskaden sind ein essentieller Baustein bei der Entwicklung der Zellarchitektur und der Anpassung auf äußere Bedingungen. Ihre Beteiligung an der Dendritenentwicklung von Nervenzellen ist nahe liegend.

3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Aus den bisher dargestellten Erkenntnissen zur Dendritenentwicklung von Purkinjezellen entwickelte sich folgende, dieser Arbeit zu Grunde liegende Überlegung: Die Dendritenentwicklung von Purkinjezellen wird durch Neurotransmitter nachhaltig beeinflusst. Diese entfalten ihre Wirkung unter anderem über rezeptorgekoppelte Signalwege auf intrazelluläre Systeme. Eine Beteiligung eines möglichen intrazellulären Effektorsystems, der PKC, wurde von Metzger und Kapfhammer (2000) bereits beschrieben. Die PKC kann über G-Protein-Rezeptor-gekoppelte Signalwege aktiviert werden. Ein an Purkinjezeldendriten in hoher Konzentration exprimierter G-Proteinrezeptor, der mit einem bekannten PKC aktivierenden Signalweg gekoppelt ist, ist der metabotrope-Glutamatrezeptor der Gruppe 1.

Es wird folgende Hypothese formuliert: mGlu-Rezeptoren der Gruppe 1 und die an sie gekoppelten Signalwege beeinflussen nachhaltig die Dendritenentwicklung von Purkinjezellen des Kleinhirns.

Ziel der gegenwärtigen Studie ist es Daten, die im Rahmen der aufgeführten Hypothese erhoben worden sind, zu überprüfen und durch neue Beobachtungen zu ergänzen. Dabei ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Hat die Aktivierung von metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe 1 (mGlu-Rezeptor 1) Auswirkungen auf die Dendritenentwicklung von Purkinjezellen?
2. Wird die Proteinkinase C über mGlu-Rezeptor 1 vermittelte Signale aktiviert?
3. Werden mGlu-Rezeptor 1-Effekte an Purkinjezellen direkt oder indirekt über Körnerzellen vermittelt?
4. Kann ein vom mGlu-Rezeptor 1 vermittelter Effekt über die Hemmung „downstream“ gelegener Botenstoffe, bzw. Enzyme blockiert werden?

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 MATERIAL

4.1.1 Tiere

Als Versuchsmodell wurden Nachkommen (F1-Generation) einer Kreuzung aus BalbC und **Black6** Mäusen (**CB6**) verwendet (CB6F1). Dieser Mäusestamm wurde im Labor bereits für frühere Untersuchungen verwendet. Die Nachkommen wurden in der Tierhaltung des Anatomischen Institutes der Universität Basel, Schweiz, gezüchtet und in einem Alter von 7 (p7) bis 8 (p8) Tagen für die Versuche verwendet. Der Tag der Geburt wurde als p0 definiert. Es wurden soweit es möglich war alle Nachkommen eines Wurfes verwendet, um unnötige Tiertötungen zu vermeiden. Zur Züchtung wurden Männchen und Weibchen 10-14 Tage in einem gemeinsamen Käfig gehalten und dann wieder voneinander getrennt, um sofortige uneingeplante Neuschwangerschaften des Muttertieres zu vermeiden.

4.1.2 Versuchsreagentien und Pharmaka

Minimal essential medium (MEM), Hank's balanced salt solution (HBSS), Glutamax I und Pferdeserum wurden bei Gibco BRL (Basel, Schweiz) bezogen. Ziegenserum wurde bei Linaris (Wertheim, Deutschland) und alle anderen Substanzen wurden bei Merck VWR (Dietikon, Schweiz) bezogen.

Rabbit anti-Calbindin D-28k wurde bei Swant (Bellinzona, Schweiz) bezogen. Dieses Antiserum enthält Antikörper gegen Ratten Calbindin, welche mit Calbindin anderer Spezies kreuzreagieren und zur Immunhistochemie geeignet sind. Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG, mit einem Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 603nm wurde bei Molecular Probes (Leiden, Niederlande) bezogen.

Die verwendeten Pharmaka darunter (RS)-3,5-Dihydroxyphenylglycine (DHPG), Phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA), (RS)- α -Methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG), 2-[1-(3-Dimethylaminopropyl)indol-3-yl]-3-(indol-3-yl)maleimide (GF109203X/GFX), 1-[6-[[[(17b)-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione (U73122), 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione-disodium (CNQX), DL-2-Amino-5-phosphonovaleric acid (APV), Tetrodotoxin (TTX) wurde von Tocris/Anawa (Wangen, Schweiz) bezogen. Xestospongine C (Xest), Chelerythrine Chloride (Chel) und 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002) wurden bei Calbiochem (Laufelfingen, Schweiz) bezogen.

4.1.3 Weitere Versuchsmaterialien

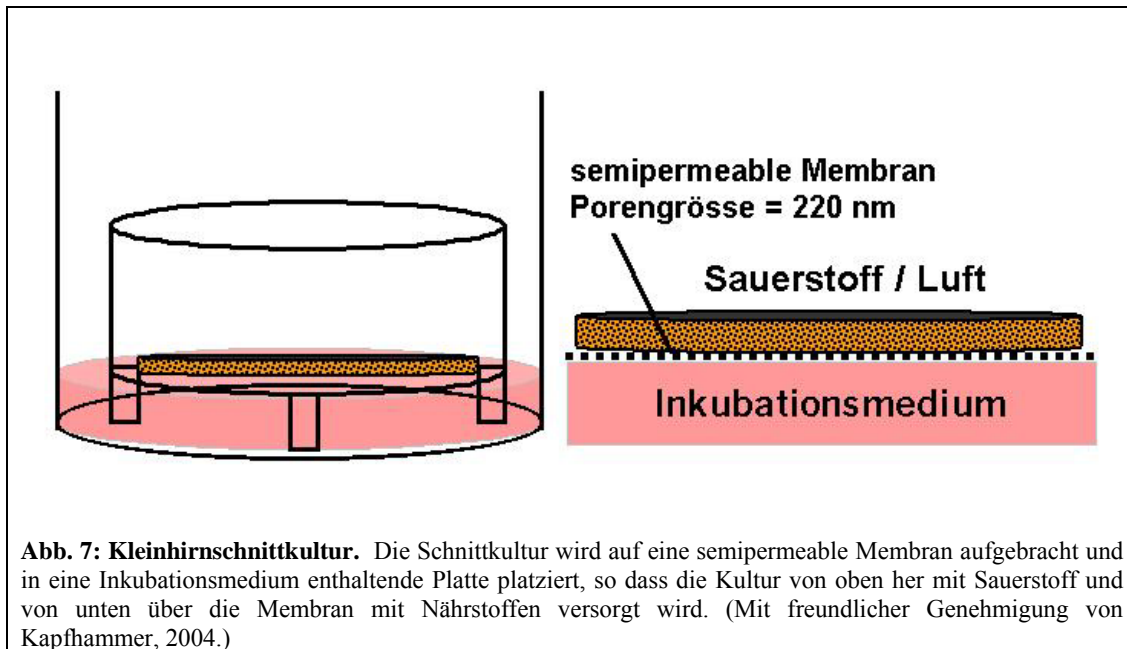
Zur Herstellung der Kleinhirnschnittkulturen wurde ein McIlwain Tissue Chopper verwendet. Die Kulturmembranen, Millicell-CM mit 220nm Porendurchmesser, stammten von Millipore (Volketswil, Schweiz). Als Kulturschalen wurden Multiwell 6 Platten von Becton Dickinson (Allschwil, Schweiz) verwendet.

4.2 METHODEN

4.2.1 Herstellung und Behandlung von Kleinhirnschnittkulturen

Nach einem modifizierten Protokoll von Stoppini (1991) wurden organotypische Kleinhirnschnittkulturen unter sterilen Bedingungen hergestellt. Es wurden 7 (p7) bis 8 Tage (p8) alte CB6F1 Mäuse dekapitiert. Hirnstamm und Kleinhirn wurden nach vorsichtiger Entfernung des Schädeldachs und der Meningen oberhalb der Vierhügelplatte stumpf vom Großhirn und Diencephalon getrennt. In eisgekühltem Präparationsmedium (Minimum Essential Medium, MEM, versetzt mit 2mM Glutamax I, pH 7,3) wurde das Kleinhirn vom Hirnstamm und den anliegenden weichen Hirnhäuten befreit. Mit dem McIlwain Tissue Chopper wurden, quer zum Verlauf der Kleinhirnwindungen, Schnitte von 350µm Dicke hergestellt. Diese Schnittführung verläuft entlang der Ebene in der sich die Dendritenbäume der Purkinjezellen verzweigen. Sie führt zu einer minimalen Verletzung der zu diesem Entwicklungszeitpunkt bereits vorhandenen Dendritenbäume. Die Schnitte wurden in eisgekühltem Präparationsmedium mit feinen Pinzetten voneinander getrennt. Jeweils sechs bis acht Schnitte wurden auf eine mit Präparationsmedium angefeuchtete Kulturmembran gebracht. Die Membran wurde in eine Kulturschale der 6-well-Platte mit 750µl Kulturmedium (25% MEM, 25% Eagles Medium, 25% HBSS, 25% Pferdeserum, plus 2mM Glutamax I und 5mM NaHCO₃, pH 7,3) gegeben. Die Kulturen wurden bei einer Temperatur von 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert (s. Abb. 7).

Das Kulturmedium und zugesetzte Pharmaka wurden alle 48 Stunden erneuert und die Kulturen auf eventuelle Kontaminationen überprüft. Die erste pharmakologische Behandlung erfolgte nach 2 Tagen in vitro (2DIV). Jede 6-well-Platte beinhaltete, soweit möglich, jeweils eine komplette Versuchsreihe und zwei Kontrollkulturen. Die Kultivierung wurde über 10 bis 12 Tage fortgesetzt. Danach erfolgte die Fixation mit 4% Paraformaldehyd bei 4°C für 6 bis 24 Stunden.



4.2.2 Immunzytochemische Färbung

Zur Permeabilisierung der Zellmembranen und zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen wurden die fixierten Kulturen mit Triton X-100 (0,3%) und Ziegen Serum (NGS 3%) in 100mM Phosphatpuffer (PB) für mindestens eine Stunde inkubiert. Es erfolgte die Inkubation mit dem ersten monoklonalen Antikörper gegen Calbindin (anti-Calbindin D-28k, 1:1000 in Phosphatpuffer mit 3% NGS und 0,3% Triton X-100), über Nacht bei 4°C. Die Kulturen wurden mehrmals gründlich mit Phosphatpuffer gewaschen. Daraufhin folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Alexa Fluor 568 anti-rabbit IgG, 1:1000 in Phosphatpuffer mit 0,1% Triton X-100) über 2 Stunden bei Zimmertemperatur und unter Abschirmung von Licht. Die Kulturen wurden danach erneut mehrfach und gründlich mit Phosphatpuffer und Triton X-100 (0,05%) gewaschen. Im Verlaufe der Versuchsreihen hatte sich gezeigt, dass ein Zusatz von Triton X-100 in niedriger Konzentration zum Waschpuffer den unspezifischen Hintergrund der Fluoreszenzfärbung vermindert.

Die Schnitte wurden nach der Färbung vorsichtig von den Membranen entfernt, auf einen Objektträger aufgezogen und mit Mowiol eingedeckt.

4.2.3 Datenerhebung, quantitative und morphologische Analyse der Dendritenbäume

Die Zellkulturen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop zunächst auf ihre Auswertbarkeit überprüft. Dabei wurde geprüft, ob in den Schnittkulturen intakte Purkinjezellen vorhanden waren und ob eine Kontamination der Kulturen vorlag. Wenn

keine intakten Zellen in den Schnittkulturen vorhanden waren oder eine Kontamination vorlag, wurden diese Kulturen von der Datenerhebung ausgeschlossen. Traf eines dieser Ausschlusskriterien auf beide mitgeführten Kontrollkulturen zu, wurde die gesamte Versuchsreihe von der Datenerhebung ausgeschlossen.

In die Datenerhebung wurden nur intakte, klar zu identifizierende Purkinjezellen aufgenommen. Die ausgewählten Purkinjezellen mussten einen intakten Dendritenbaum haben, der sich gut von den Dendritenbäumen der benachbarten Zellen abgrenzen ließ und sie mussten ein identifizierbares Axon aufweisen. Diese Zellen wurden bei einer 200fachen Vergrößerung mit einer gekühlten Digitalkamera fotografiert. Durch die Schnittführung bei Herstellung der Kulturen und die Abflachung der Schnitte auf eine Dicke von ca. 150µm während der Kultivierung, war es möglich die Dendritenbäume nahezu vollständig in einer Ebene zu erfassen.

Die erfassten Bilder wurden mit dem Image Pro Plus Programm (von Media Cybernetics, USA) analysiert und folgende Daten wurden erhoben:

Fläche und Expansion der Dendritenbäume: Der gesamte Dendritenbaum und der Zellkörper wurden mit einer Markierung umfahren und die so erfasste Fläche wurde als absolute Fläche in μm^2 angegeben. Die Expansion wurde in einer geraden Linie vom Mittelpunkt des Zellkörpers zur Spitze des längsten Dendritenastes gemessen und in μm angegeben.

Anzahl der Verzweigungen: Gezählt wurden hierbei nur die Verzweigungen von Dendriten mit mehr als 0,5cm Länge auf dem Bildschirm. Es wurden absolute Zahlen angegeben.

Verzweigungsindex: Dieser gibt für jede Purkinjezelle das Verhältnis zwischen Anzahl der Verzweigungen und Fläche des Dendritenbaumes an. Der Verzweigungsindex wurde als Verzweigungszahl pro 1000 μm^2 Fläche angegeben.

4.2.4 Statistische Auswertung

Versuchsreihen wurden mindestens drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt, soweit nicht anders angegeben. Mindestens 15 Zellen jedes Versuches wurden auf die oben beschriebene Art ausgewertet und die Ergebnisse gepoolt. Ergebnisse wurden als Mittelwert ausgedrückt. Auf die Analyse einer Normalverteilung der Werte wurde verzichtet und die Daten als nicht normalverteilt behandelt. Daher wurde zur Signifikanzermittlung der Mann-Whitney-Test verwendet, bei Vergleich von mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis Test. Bei der statistischen Auswertung wurde somit ein möglicherweise vergrößerter Fehler zweiter Art in Kauf genommen. Bei diesem könnten

Signifikanzen als nicht signifikant übersehen werden, sollten die Daten entgegen der Annahme normalverteilt sein. Signifikanz wurde definiert als $p < 0,05$.

4.2.5 Versuchsreihen

Aus den unter 1.4 dargestellten Fragestellungen ergaben sich folgende Versuchsreihen:

Ad 1: Auswirkung der Aktivierung von mGlu-Rezeptor 1 auf die Dendritenentwicklung von Purkinjezellen. Es erfolgte die Behandlung der Kulturen mit dem spezifischen mGlu-Rezeptor 1 Agonist DHPG (immer $75\mu\text{M}$), und die Kombinationsbehandlung von DHPG mit dem mGlu-Rezeptor Antagonist MCPG (1mM) zur Untersuchung, ob eventuelle Effekte spezifisch über mGlu-Rezeptoren vermittelt sind.

Ad 2: Aktivierung der PKC über mGlu-Rezeptor 1. Hierfür erfolgte die Behandlung mit DHPG jeweils in Kombination mit den spezifischen PKC Hemmstoffen Chelerythrin ($2,5\mu\text{M}$) und GFX ($1\mu\text{M}$).

Ad 3: Da ein durch DHPG vermittelter Effekt auf Purkinjezellendriten auch über Körnerzellen vermittelt sein könnte, wurden Versuchsreihen mit den Wirkstoffkombinationen DHPG und CNQX ($40\mu\text{M}$) - einem selektiven AMPA/Kainat-Rezeptor Antagonist - und DHPG mit APV ($100\mu\text{M}$) - einem NMDA-Rezeptor Antagonist - durchgeführt. Eine Behandlungsreihe mit DHPG in Kombination mit dem Natrium-Kanal-Blocker TTX ($1\mu\text{M}$) wurde ebenfalls durchgeführt. TTX blockiert jegliche über Natrium-Kanäle vermittelten Aktionspotentiale. Die Wirkung von Körnerzellaktivität auf Purkinjezellendriten über diesen Mechanismus sollte dadurch ausgeschlossen werden.

Ad 4: Kann ein mGlu-Rezeptor 1 vermittelter Effekt durch Hemmung „downstream“ gelegener Signale, bzw. Enzyme blockiert werden? Es erfolgte die Behandlung mit DHPG in Kombination mit U73122 ($10\mu\text{M}$) - einem Hemmstoff der Phospholipase C - und die Behandlung mit DHPG in Kombination mit Xestospongine ($1\mu\text{M}$) - einem Antagonisten intrazellulärer IP3 Rezeptoren.

Auf der Suche nach Möglichkeiten intrazelluläre Botenstoffe, insbesondere das IP3 zu beeinflussen, wurde mit einem spezifischen Hemmstoff der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), LY294002 ($8\mu\text{M}$) in Kombination mit DHPG behandelt.

Eine Übersicht über die Versuchsreihen findet sich in Tabelle 1.

Tab. 1: Versuchsreihen und Substanzwirkungen

<i>Nr.</i>	<i>Substanz</i>	<i>Wirkung</i>	<i>Anzahl</i>
1	DHPG (75µM)	Aktivierung mGlu-Rezeptor 1	3
2	DHPG+ MCPG (1mM)	+ Hemmung mGlu-Rezeptor 1	3
3	DHPG+ CNQX (40µM)	+ Hemmung AMPA/Kainat-Rezeptoren	3
4	DHPG+ APV (100µM)	+ Hemmung NMDA-Rezeptoren	3
5	DHPG+ TTX (1µM)	+ Blockade von Natrium-Kanälen	3
6	DHPG+ Chel. (2.5µM)	+ Hemmung PKC	3
7	DHPG+ GFX (1µM)	+ Hemmung PKC	3
8	DHPG+ U73122 (10µM)	+ Hemmung PLC	2
9	DHPG+ Xest. (1µM)	+ Hemmung intraz. IP3-Rezeptoren	2
10	DHPG+ LY294002 (8µM)	+ Hemmung PI3-Kinase	2
11	PMA (75µM)	Aktivierung PKC	3

Es wurden elf Versuchsreihen durchgeführt die jeweils drei, beziehungsweise zwei Mal wiederholt wurden. Bei jeder Versuchsreihe wurden mindestens zwei Kontrollkulturen mitgeführt. mGlu-Rezeptoren wurden pharmakologisch aktiviert und mit Hemmstoffen der angenommenen Effektorsysteme kombiniert.

5 ERGEBNISSE

5.1 DENDRITENENTWICKLUNG VON PURKINJEZELLEN IN ORGANTYPISCHEN SCHNITTKULTUREN

Es wurde die Dendritenentwicklung von Purkinjezellen über eine Dauer von 10 bis 12 Tagen *in vitro* (10-12 DIV) in organtypischen Schnittkulturen untersucht. Nach immunzytochemischer Färbung wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop die Dendritenbäume der Purkinjezellen analysiert. In vielen Regionen des Sagittalschnittes fanden sich Purkinjezellen in mehrschichtiger Anordnung. Diese konnten auf Grund der Überschneidungen ihrer Dendritenbäume nicht in die Auswertung mit einbezogen werden. In anderen Regionen lagen Purkinjezellen isoliert. Ihre Dendritenmorphologie konnte untersucht werden. Die Versuchsreihen, deren Mittelwerte nach statistischer Auswertung größer als die doppelte Standardabweichung waren, wurden von der weiteren statistischen Auswertung ausgeschlossen. Die Zellen entwickelten in bezug auf Komplexität und Struktur purkinjezelltypische Dendritenbäume. Über 12 DIV entwickelten sich zunächst primäre Dendriten die im Verlaufe zahlreiche Verzweigungen bildeten und sich in einer Ebene ausrichteten. Die Purkinjezellen der Schnittkulturen fanden sich in einem Bereich, welcher der anatomischen Purkinjezellschicht zwischen Körnerzellschicht und Molekularschicht entspricht (s. Abb. 8). Die Axone der Purkinjezellen projizierten ins Marklager (Kapfhammer 2000).

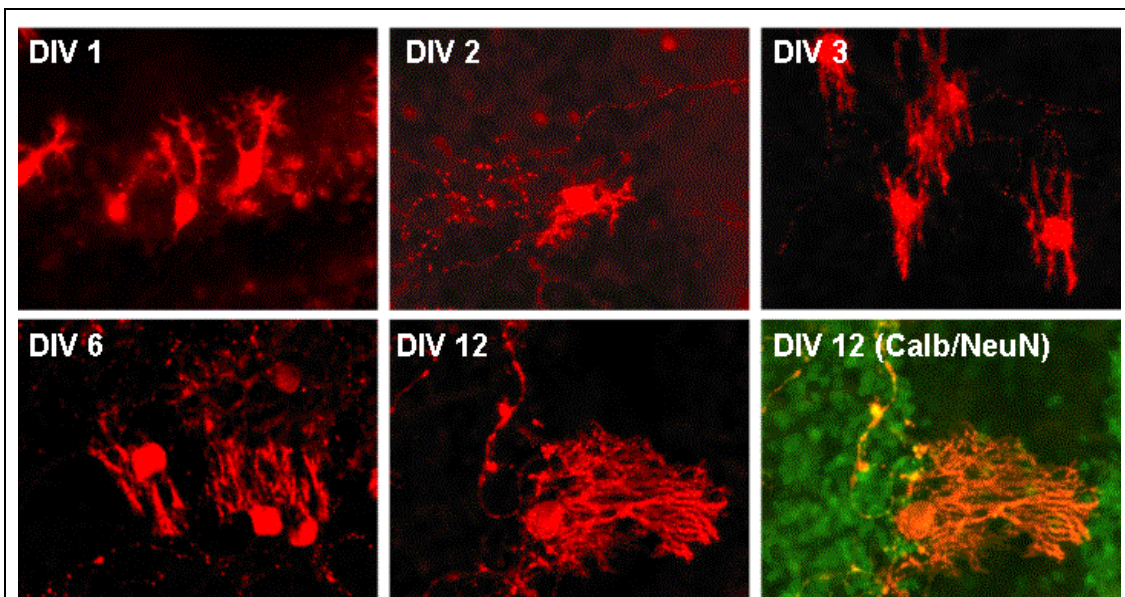


Abb. 8: Purkinjezellen *in vitro*. Wachstum der Purkinjezeldendriten über 12 DIV. Kontrolle der Lage der Purkinjezellen in organtypischen Schnittkulturen über Fluoreszenzfärbung der äußeren und inneren Körnerzellschicht mit NeuN (Fluoreszenzfärbung der Körnerzellen) und Calbindin (Fluoreszenzfärbung der Purkinjezellen). Die Purkinjezellen liegen in einer Schicht zwischen innerer und äußerer Körnerzellschicht. Ihr Dendritenbaum nimmt in Größe und Verzweigung über 12 DIV zu. (Mit freundlicher Genehmigung von Adcock et al., 2004)

In Kontrollkulturen betrug die mittlere Fläche $19593\mu\text{m}^2$. Die Expansion (d.h. die Distanz vom Zellkörper zur Spitze des längsten Dendriten) betrug $202,5\mu\text{m}$, die mittlere Verzweigungszahl 37,25 und der Verzweigungsindex 19,01 Verzweigungspunkte/ $1000\mu\text{m}^2$. Signifikante Unterschiede in Fläche, Expansion, Verzweigung und Verzweigungsindex zwischen Zellen 10 DIV und 12 DIV konnten nicht festgestellt werden.

5.2 mGLU-REZEPTOREN 1 UND DENDRITENENTWICKLUNG VON PURKINJEZELLEN

Der Effekt einer Aktivierung mGlu-Rezeptoren 1 auf die Dendritenmorphologie wurde nach pharmakologischer Behandlung mit einem mGlu-Rezeptor 1 Agonist (DHPG $75\mu\text{M}$) nach 10 DIV untersucht. Dendriten der so behandelten Kulturen erschienen stark verkleinert, verkürzt und weniger verzweigt im Vergleich zu Kontrollzellen (s. Abb. 9). Die mittlere Fläche der DHPG behandelten Zellen betrug $7672,4\mu\text{m}^2$. Im Vergleich zu den Kontrollzellen mit einer Fläche von $19593,0\mu\text{m}^2$ lag also eine signifikante ($p<0,0001$) Verkleinerung der Zellfläche von über 60% (60,84%) vor. Die mittlere Expansion der Dendritenbäume, gemessen vom Mittelpunkt des Zellkörpers, betrug bei DHPG behandelten Zellen $143\mu\text{m}$. Eine signifikante Verkürzung der Dendritenbäume, im Vergleich zu Kontrollzellen mit einer durchschnittlichen Länge von $202,5\mu\text{m}$, lag ebenfalls vor ($p<0,0001$). Die mittlere Verzweigungszahl betrug bei DHPG behandelten Zellen 11,42 und war damit im Vergleich zu Kontrollzellen mit 37,25 signifikant reduziert ($p<0,0001$). Der Verzweigungsindex, definiert als absolute Verzweigungsanzahl im Verhältnis zur Fläche, betrug bei diesen Zellen 14,88 Verzweigungspunkte/ $1000\mu\text{m}^2$ ($p=0,0166$) und bei Kontrollzellen 19,01 Verzweigungspunkte/ $1000\mu\text{m}^2$ (s. Tab. 2 und Abb. 10). Zur Verifizierung eines spezifischen mGlu-Rezeptor 1 Effektes wurden die Effekte auf die Dendritenmorphologie nach Kombinationsbehandlung der Kulturen mit DHPG ($75\mu\text{M}$) und einem spezifischen Antagonisten für mGlu-Rezeptoren 1 und 2 (MCPG 1mM) untersucht. Unter dieser Kombinationsbehandlung entwickelten Purkinjezellen große, komplexe Dendritenstrukturen mit vielen Verzweigungen (s. Abb. 9). Sie waren morphologisch vergleichbar mit Kontrollzellen. Die mittlere Fläche unter Kombinationsbehandlung mit DHPG $75\mu\text{M}$ und MCPG 1mM betrug $18413,7\mu\text{m}^2$. Eine signifikante Flächenreduktion im Vergleich zu den Kontrollzellen lag nicht vor ($p=0,1310$). Es lag auch keine signifikante Verkürzung der Dendriten (mittlere Expansion $204,4\mu\text{m}$, $p=0,8144$), keine signifikante Reduktion der Dendritenverzweigung (mittlere Verzweigungszahl 34,00, $p=0,2139$) und keine signifikante Änderung des Verzweigungsindex ($18,46$ Verzweigungspunkte/ $1000\mu\text{m}^2$, $p=0,5444$) im Vergleich zu

Kontrollzellen vor. Die Einzelbehandlung mit MCPG ergab keine signifikanten Unterschiede in mittlerer Fläche ($18968,9\mu\text{m}^2$, $p=0,7443$), mittlerer Expansion ($216\mu\text{m}$, $p=0,0304$), mittlerer Verzweigung ($38,50$, $p=0,9539$) und Verzweigungsindex ($20,32$ Verzweigungspunkte/ $1000\mu\text{m}^2$, $p=0,7508$), sowohl im Vergleich mit den Kontrollzellen als auch im Vergleich mit den Zellen unter Kombinationsbehandlung mit DHPG und MCPG (s. Tab. 2 und Abb. 10). Die mit DHPG behandelten Kulturen zeigten eine große morphologische Ähnlichkeit mit Zellen, welche unter einer Behandlung mit dem spezifischen PKC Agonisten PMA ($75\mu\text{M}$) über 10 DIV standen (s. Abb. 9). Die mittlere Fläche der mit PMA behandelten Zellen betrug $5679,3\mu\text{m}^2$. Eine signifikante Flächenreduktion im Vergleich zur Kontrollkultur ($19593,0\mu\text{m}^2$) lag vor ($p<0,0001$). Die mittlere Expansion der mit PMA behandelten Zellen lag bei $114,7\mu\text{m}$ (Kontrolle $202,5\mu\text{m}$). Mit einem p-Wert $<0,0001$ lag auch in diesem Falle eine signifikante Verkürzung der Dendritenbäume im Vergleich zur Kontrollkultur vor. Die mittlere Verzweigungszahl der PMA behandelten Zellen betrug $4,167$ (Kontrolle $37,25$) und war ebenfalls signifikant reduziert ($p<0,0001$). Der Verzweigungsindex bei PMA behandelten Zellen betrug $7,33$ Verzweigungspunkte/ $1000\mu\text{m}^2$ (Kontrolle $19,01$ Verzweigungspunkte/ $1000\mu\text{m}^2$, $p<0,0001$) (s. Tab. 2 und Abb. 10).

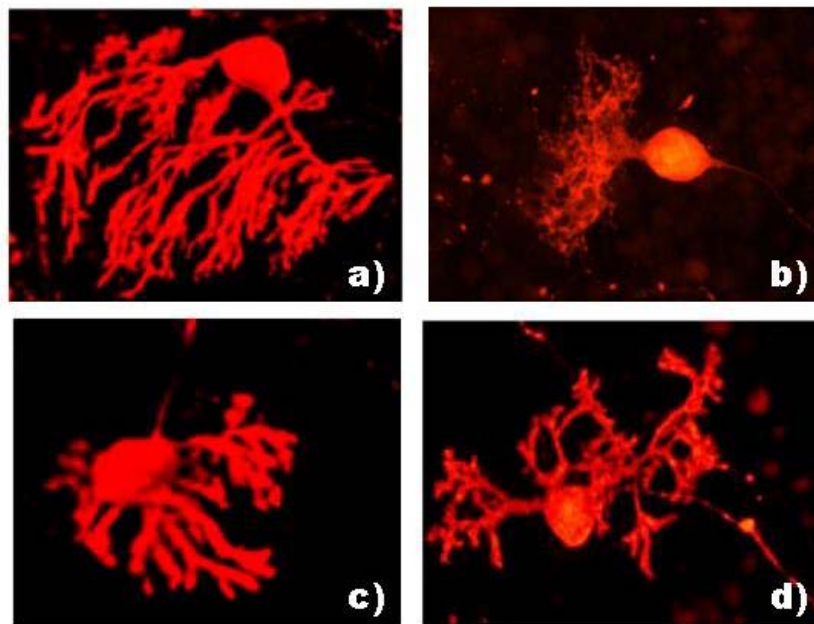


Abb. 9: Morphologie der Purkinjezellen. a) Kontrollzelle, b) Zelle unter DHPG-Behandlung, c) Zelle unter PMA-Behandlung, d) Zelle unter DHPG und MCPG-Behandlung. DHPG und PMA behandelte Zellen ähneln sich in Größe und Dendritenmorphologie. Unter Kombination von DHPG und MCPG ist der reine DHPG-Effekt blockierbar.

Tab. 2: Ergebnisübersicht für 4.2.

	Behandlung	Kontrolle	DHPG	PMA	MCPG	DHPG+MCPG
Flä	Anzahl	193	171	55	67	59
	Mean	19593,0	7672,4	5679,3	18968,9	18413,7
	p-Wert		<0,0001***	<0,0001***	0,7443	0,1310
Expa	Anzahl	193	171	55	67	59
	Mean	202,5	143,0	114,7	216,0	204,4
	p-Wert		<0,0001***	<0,0001***	0,0304	0,8144
BP	Anzahl	20	20	20	20	20
	Mean	37,25	11,42	4,167	38,56	34,00
	p-Wert		<0,0001 ***	<0,0001 ***	0,9539	0,2139 **
BPI	Anzahl	20	20	20	20	20
	Mean	19,01	14,88	7,33	20,32	18,46
	p-Wert		0,0166 *	< 0,0001 ***	0,7508	0,5444

Flächen (Flä) sind in der Einheit [μm^2] und Expansionen (Expa) in [μm] angegeben. Verzweigungen (BP) sind in absoluten Zahlen und Verzweigungsindizes (BPI) in Verzweigungspunkte/1000 μm^2 angegeben. P-Werte gelten für den Vergleich mit Kontrollzellen.

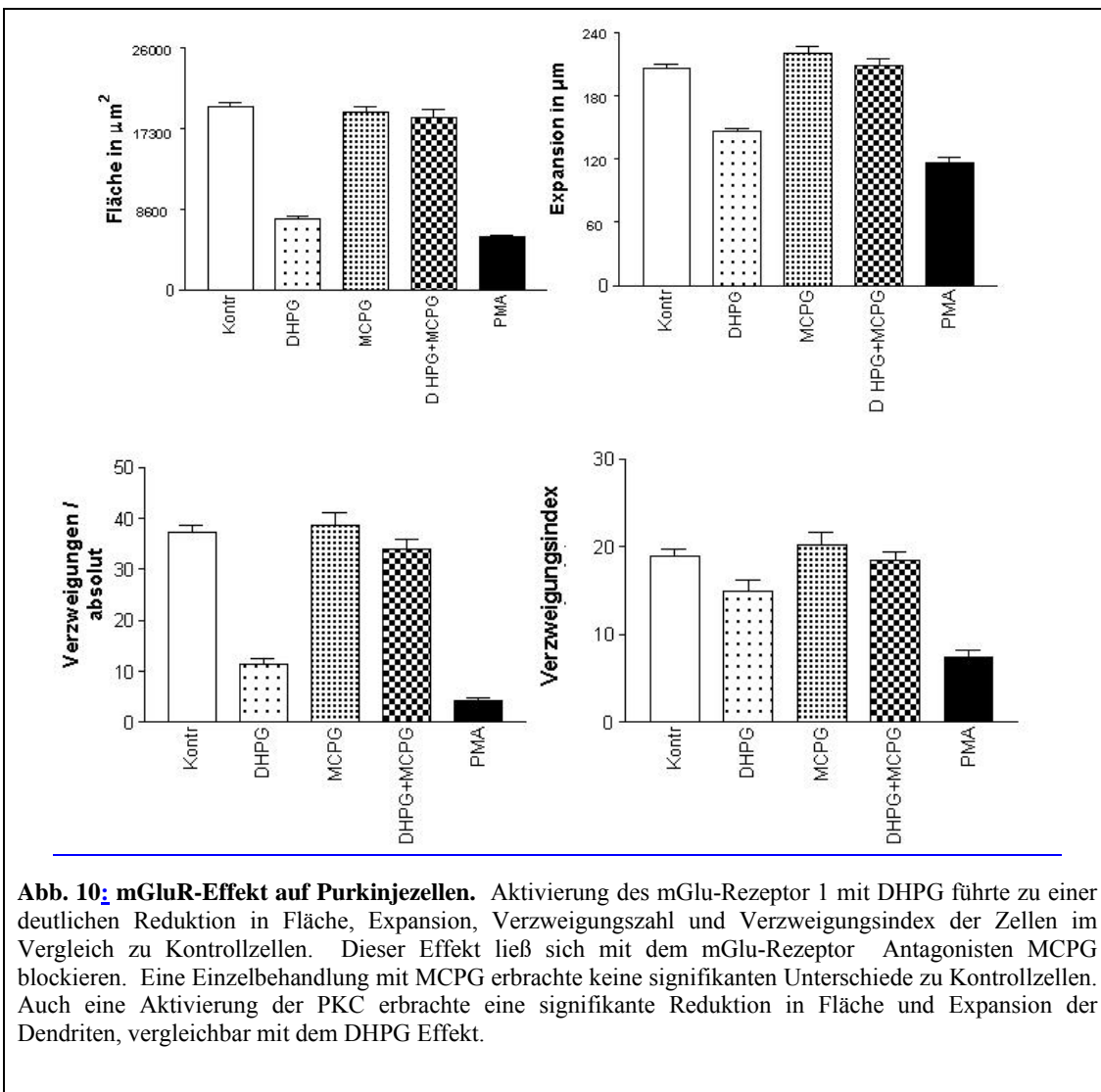


Abb. 10: mGluR-Effekt auf Purkinjezellen. Aktivierung des mGlu-Rezeptor 1 mit DHPG führte zu einer deutlichen Reduktion in Fläche, Expansion, Verzweigungszahl und Verzweigungsindex der Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. Dieser Effekt ließ sich mit dem mGlu-Rezeptor Antagonisten MCPG blockieren. Eine Einzelbehandlung mit MCPG erbrachte keine signifikanten Unterschiede zu Kontrollzellen. Auch eine Aktivierung der PKC erbrachte eine signifikante Reduktion in Fläche und Expansion der Dendriten, vergleichbar mit dem DHPG Effekt.

5.3 *mGLU-REZEPTOR 1 UND PKC VERMITTELTE EFFEKTE*

Da die Aktivierung von mGlu-Rezeptoren 1 oder der PKC auf die Dendritenmorphologie vergleichbare Effekte haben, wurden Kombinationsbehandlungen der Kulturen mit DHPG und jeweils einem selektiven PKC Inhibitor - Cheleretrine oder GFX - durchgeführt. Die gleichzeitige Aktivierung von mGlu-Rezeptoren 1 und Hemmung der PKC über 10 DIV zeigte keine signifikanten morphologischen Veränderungen in der Dendritenentwicklung im Vergleich zur Einzelbehandlung mit DHPG. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigten sich Purkinjezellen mit kleinen, kurzen Dendriten und wenigen Verzweigungen (s. Abb. 11).

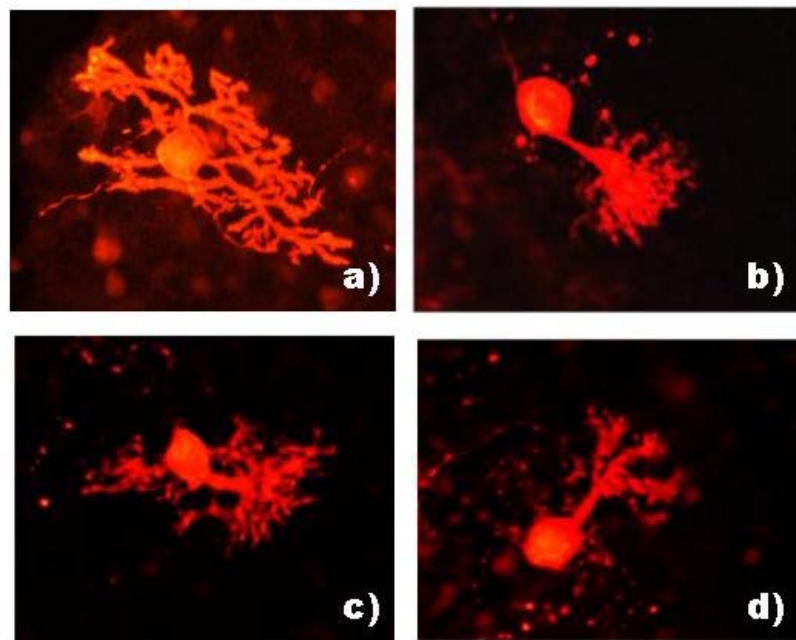


Abb. 11: Morphologie der Purkinjezellen. a) Kontrollzelle, b) Zelle unter DHPG-Behandlung, c) Zelle unter Kombinationsbehandlung mit DHPG und Cheleretrine, d) Zelle unter Kombinationsbehandlung mit DHPG und GFX. Eine Hemmung des DHPG-Effektes ist mit Cheleretrine oder GFX nicht sichtbar.

Die Einzelbehandlung mit GFX ergab keine signifikanten morphologischen Unterschiede zu Kontrollkulturen. Die Einzelbehandlung mit Cheleretrine ergab lediglich eine leicht signifikant erhöhte Expansion der Dendriten von 202,5 μm auf 216,8 μm im Mittel. Es zeigte sich außerdem in der Einzelbehandlung mit GFX eine leicht signifikante Reduktion des Verzweigungsindex (s. Tab. 4 und Abb. 12). Die mittlere Fläche unter Kombinationsbehandlung mit DHPG (75 μM) und Cheleretrine (2,5 μM) betrug 9382,7 μm^2 und 8362,06 μm^2 unter Kombinationsbehandlung mit DHPG und GFX (1 μM). Eine

signifikante Flächenreduktion im Vergleich zur Kontrolle lag in beiden Versuchsreihen vor (p-Werte in beiden Versuchsreihen $<0,0001$). Jedoch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Einzelbehandlung mit DHPG. Die mittlere Expansion betrug $159,5\mu\text{m}$ für DHPG+Cheleretrine und $146,76\mu\text{m}$ für DHPG+GFX. Es lag eine signifikante Verkürzung der Dendriten im Vergleich zur Kontrolle vor (p-Werte in beiden Versuchsreihen ebenfalls $<0,0001$). Jedoch ergaben sich wiederum keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur DHPG behandelten Zellen. Unter Kombinationsbehandlung mit DHPG und Cheleretrine bestand eine signifikante Reduktion der Dendritenverzweigung (mittlere Verzweigungszahl 9,50, $p<0,0001$) und des Verzweigungsindex ($10,12$ Verzweigungspunkte/ $1000\mu\text{m}^2$, $p=0,0004$) im Vergleich zur Kontrollkultur (Verzweigungszahl von 37,25 und einem Verzweigungsindex von $19,01$ Verzweigungspunkte/ $1000\mu\text{m}^2$). Auch unter Kombinationsbehandlung mit DHPG und GFX konnte eine signifikante Änderung in Verzweigungszahl ($11,92$, $p<0,0001$), und Verzweigungsindex ($14,25$ Verzweigungspunkte/ $1000\mu\text{m}^2$, $p=0,0024$) im Vergleich zu den Kontrollkulturen festgestellt werden. Jedoch ergaben sich wiederum keine signifikanten Unterschiede beider Kombinationsbehandlungen im Vergleich zur Einzelbehandlung mit DHPG (s. Tab. 3 und Abb. 12).

Tab. 3: Ergebnisübersicht für 4.3.

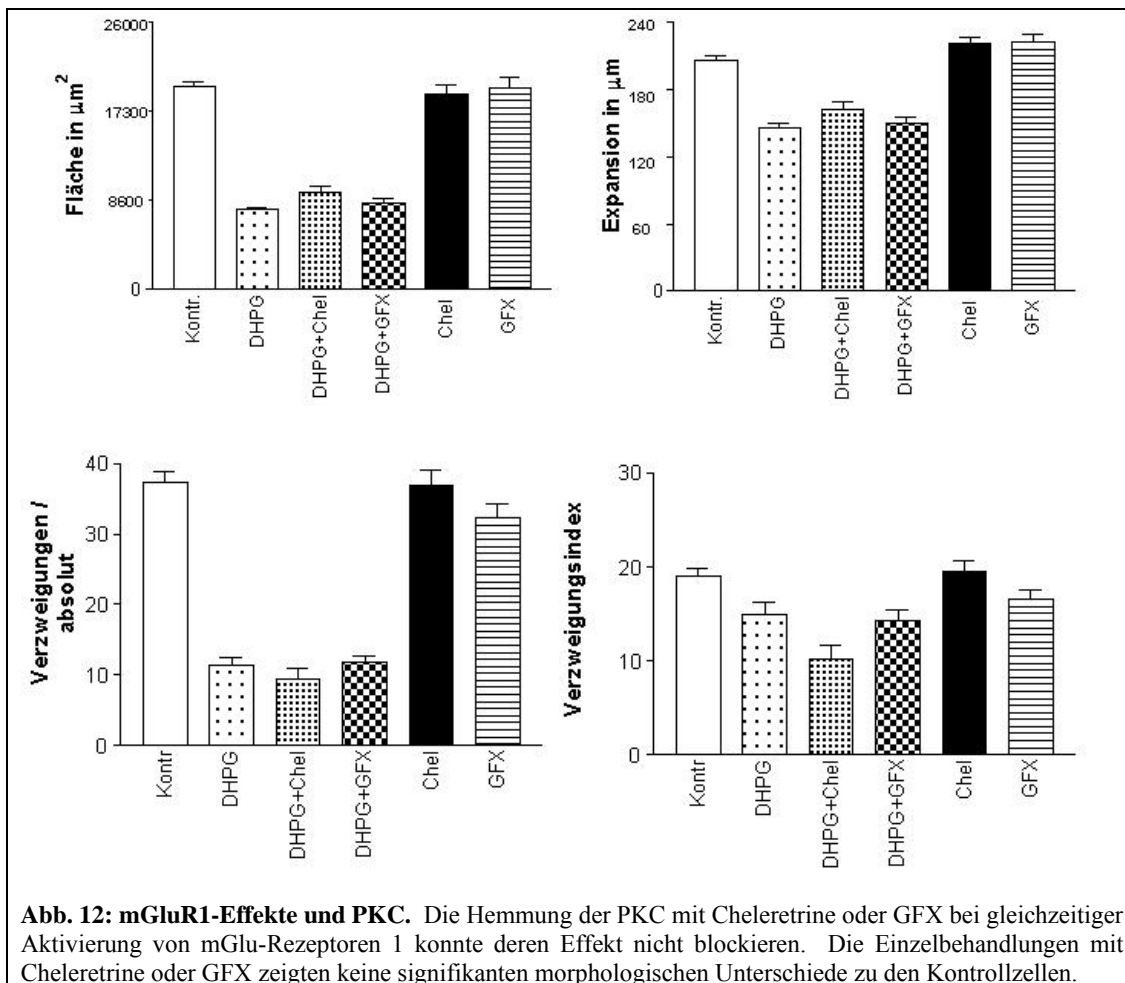
	<u>Behandlung</u>	<u>Kontrolle</u>	<u>DHPG</u>	<u>DHPG+Chel</u>	<u>DHPG+GFX</u>
Flä	Anzahl	193	171	65	71
	Mean	19593,0	7672,4	9382,7	8362,1
	p-Wert		$<0,0001^{***}$	$<0,0001^{***}$	$<0,0001^{***}$
Expa	Anzahl	193	171	65	71
	Mean	202,5	143,0	159,5	146,8
	p-Wert		$<0,0001^{***}$	$<0,0001^{***}$	$<0,0001^{***}$
BP	Anzahl	20	20	20	20
	Mean	37,25	11,42	9,5	11,92
	p-Wert		$<0,0001^{***}$	$<0,0001^{***}$	$<0,0001^{***}$
BPI	Anzahl	20	20	20	20
	Mean	19,01	14,88	10,12	14,25
	p-Wert		$0,0166^*$	$0,0004^{***}$	$0,0024^{**}$

Flächen (Flä) sind in der Einheit $[\mu\text{m}^2]$ und Expansionen (Expa) in $[\mu\text{m}]$ angegeben. Verzweigungen (BP) sind in absoluten Zahlen und Verzweigungsindizes (BPI) in Verzweigungen/ $1000\mu\text{m}^2$ angegeben. P-Werte gelten für den Vergleich mit Kontrollzellen.

Tab. 4: Ergebnisübersicht Einzelbehandlungen für 4.3.

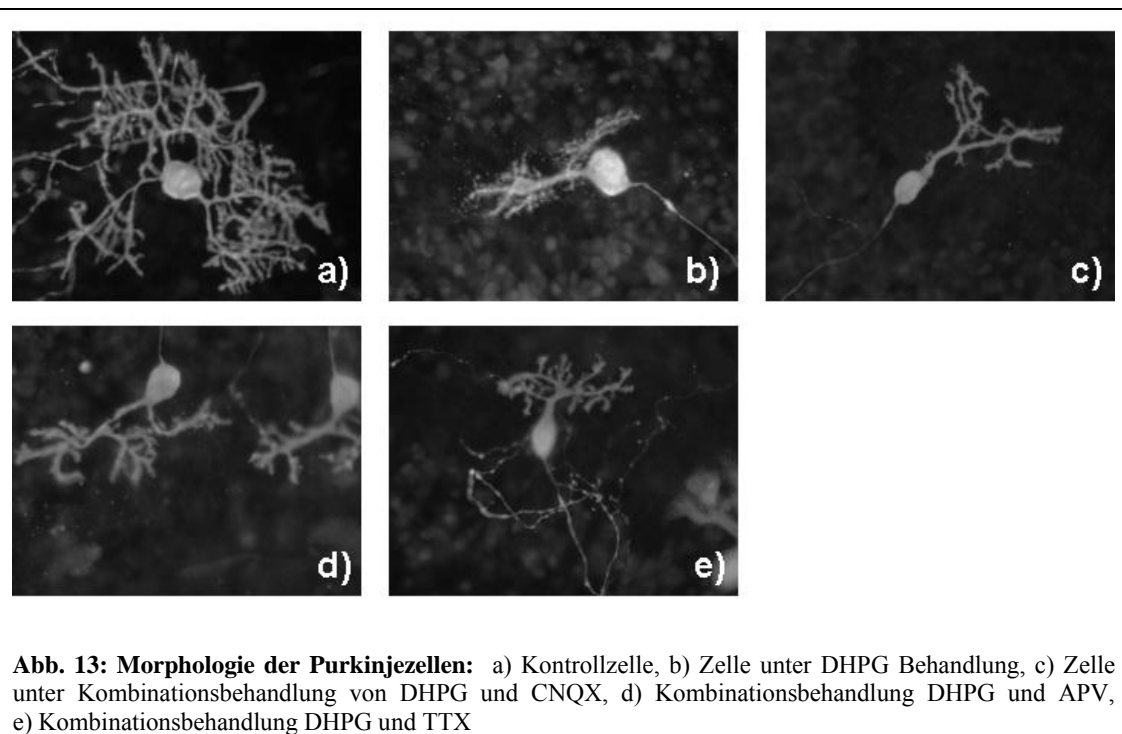
	Behandlung	Kontrolle	DHPG	Chel	GFX
Flä	Anzahl	193	171	54	65
	Mean	19593,0	7672,4	18927,6	19520,7
	p-Wert		<0,0001***	0,6440	0,6012
Expa	Anzahl	193	171	54	65
	Mean	202,5	143,0	216,8	217,5
	p-Wert		<0,0001***	0,0101 *	0,0570
BP	Anzahl	20	20	20	20
	Mean	37,25	11,42	36,83	32,25
	p-Wert		<0,0001 ***	0,5827	0,0304
BPI	Anzahl	20	20	20	20
	Mean	19,01	14,88	19,46	16,52
	p-Wert		0,0166 *	0,7075	0,0351 *

Flächen (Flä) sind in der Einheit [μm^2] und Expansionen (Expan) in [μm] angegeben. Verzweigungen (BP) sind in absoluten Zahlen und Verzweigungsindizes (BPI) in Verzweigungen/1000 μm^2 angegeben. P-Werte gelten für den Vergleich mit Kontrollzellen.



5.4 *mGLU-REZEPTOR 1 VERMITTELTE EFFEKTE UND KÖRNERZELLEN*

Zur Untersuchung, ob der DHPG Effekt indirekt über Körnerzellen vermittelt wird, wurden Kombinationsbehandlungen mit DHPG und jeweils mit dem spezifischen AMPA/Kainat-Rezeptorantagonisten - CNQX - sowie einem spezifischen NMDA-Rezeptorantagonist - APV - und dem Na-Kanalblocker - TTX - durchgeführt. Die Blockade ionotroper Glutamaterezeptoren und natriumabhängiger Aktionspotentiale hemmen die Übertragung afferenter Impulse von Körnerzellen auf Purkinjezellen. Ein indirekter DHPG vermittelter Effekt über Körnerzellen wurde dadurch unwahrscheinlich. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der mGlu-Rezeptor vermittelte Effekt durch die Hemmung afferenter Körnerzellimpulse nicht blockiert werden konnte (s. Abb. 13).



Die Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass die Wirkungen durch Aktivierung von mGlu-Rezeptoren auf Purkinjezellen hervorgerufen werden. In den Einzelergebnissen gab es bei Kombinationsbehandlungen von DHPG mit CNQX, APV und TTX keine signifikanten Unterschiede in Fläche, Expansion, Verzweigung und Verzweigungsindex im Vergleich zur Einzelbehandlung mit DHPG (s. Tab. 5 und Abb. 14). Die Einzelbehandlungen mit CNQX oder APV zeigten keine morphologischen Unterschiede zu Kontrollzellen. Die Hemmung natriumabhängiger Aktionspotentiale mit TTX führte bereits in der Einzelbehandlung zu einer geringen aber signifikanten Verkleinerung der

Zellen und einer Reduktion der Expansion im Vergleich zu Kontrollzellen (s. Tab. 6 und Abb.14). Dieser Effekt wurde durch die Kombination mit DHPG jedoch nicht verstärkt. Unter Kombinationsbehandlung von DHPG und TTX waren die Zellen vergleichbar mit denen unter Einzelbehandlung mit DHPG (s. Tab. 5 und Abb. 14).

Tab. 5: Ergebnisübersicht für 4.4.

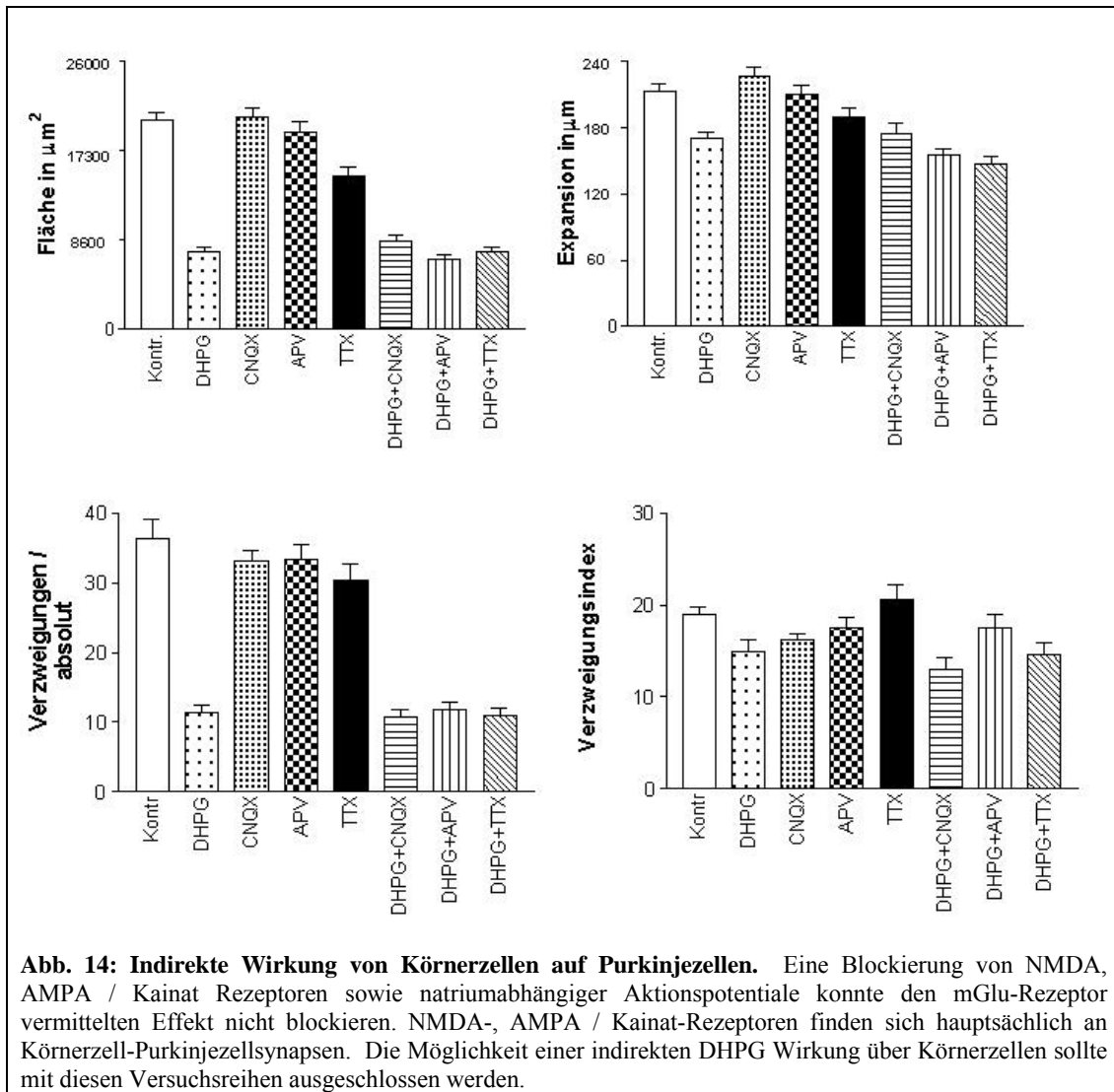
	<u>Behandlung</u>	<u>Kontrolle</u>	<u>DHPG</u>	<u>DHPG + CNQX</u>	<u>DHPG + APV</u>	<u>DHPG + TTX</u>
Flä	Anzahl	193	171	44	44	42
	Mean	19593,0	7672,4	8558,6	6772,4	7475,9
	p-Wert		<0,0001***	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***
Expa	Anzahl	193	171	44	44	42
	Mean	202,5	143,0	171,3	152,4	144,1
	p-Wert		<0,0001***	0,0004 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***
BP	Anzahl	20	20	20	20	20
	Mean	37,25	11,42	10,67	11,83	10,92
	p-Wert		<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***
BPI	Anzahl	20	20	20	20	20
	Mean	19,01	14,88	12,46	17,47	14,61
	p-Wert		0,0166 *	0,0036 **	0,2603	0,0194 *

Flächen (Flä) sind in der Einheit [μm^2] und Expansionen (Expa) in [μm] angegeben. Verzweigungen (BP) sind in absoluten Zahlen und Verzweigungsindizes (BPI) in Verzweigungen/1000 μm^2 angegeben. P-Werte gelten für den Vergleich mit Kontrollzellen.

Tab. 6: Ergebnisübersicht Einzelbehandlungen für 4.4

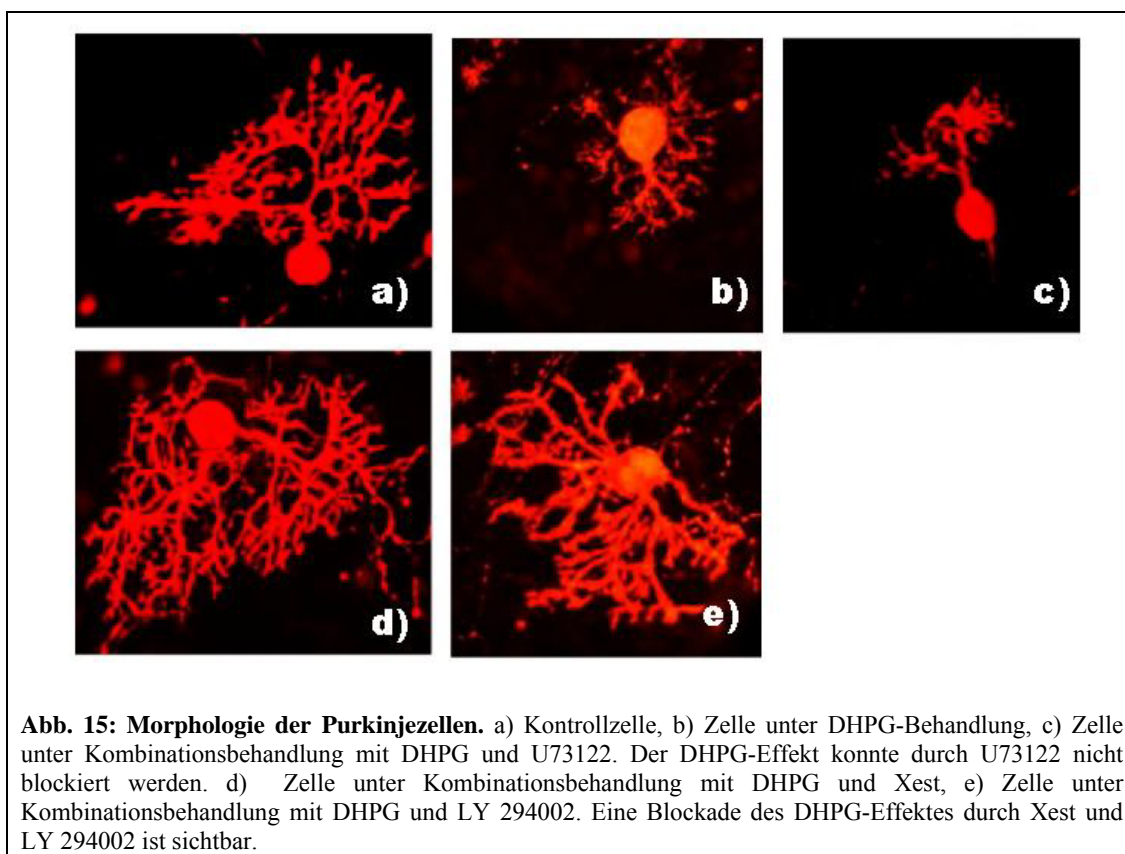
	<u>Behandlung</u>	<u>Kontrolle</u>	<u>DHPG</u>	<u>CNQX</u>	<u>APV</u>	<u>TTX</u>
Flä	Anzahl	193	171	43	40	41
	Mean	19593,0	7672,4	20506,9	19020,7	14724,1
	p-Wert		<0,0001***	0,9734	0,1889	<0,0001
Expa	Anzahl	193	171	43	40	41
	Mean	202,5	143,0	222,6	206,4	185,6
	p-Wert		<0,0001***	0,2136	0,8668	0,0177 **
BP	Anzahl	20	20	20	20	20
	Mean	37,25	11,42	33,08	33,42	30,33
	p-Wert		<0,0001 ***	0,4528	0,5066	0,1934
BPI	Anzahl	20	20	20	20	20
	Mean	19,01	14,88	16,13	17,57	20,59
	p-Wert		0,0166 *	0,0194*	0,1940	0,5834

Flächen (Flä) sind in der Einheit [μm^2] und Expansionen (Expa) in [μm] angegeben. Verzweigungen (BP) sind in absoluten Zahlen und Verzweigungsindizes (BPI) in Verzweigungen/1000 μm^2 angegeben. P-Werte gelten für den Vergleich mit Kontrollzellen.



5.5 *mGLU-REZEPTOR 1 - ASSOZIIERTE SIGNALWEGE UND PURKINJEZELL-DENDRITENENTWICKLUNG*

Zur Analyse ob sich der mGlu-Rezeptor 1 vermittelte Effekt durch Hemmung rezeptorassoziierter Signale blockieren lässt, wurden Kombinationsbehandlungen mit verschiedenen Substanzen durchgeführt, die nachgeschaltete Signalwege blockieren können. Im Einzelnen wurde versucht die Phospholipase C mit dem spezifischen Inhibitor U73122 zu hemmen, die Wirkung des zweiten Botenstoffes IP₃ durch den IP₃-Rezeptor Antagonisten Xestospongine zu hemmen und einen Weiteren eventuell involvierten Signalweg über die PI3-Kinase durch LY294002 zu blockieren. Einen Überblick über die morphologischen Veränderungen zeigt Abb. 15.



Bei der Kombination von DHPG mit dem Phospholipase C Inhibitor - U73122 - über 10 DIV konnte keine Beeinflussung des mGlu-Rezeptoreffektes beobachtet werden. Eine Einzelbehandlung mit U73122 zeigte wiederum keine signifikanten Auswirkungen auf die Dendritenmorphologie im Vergleich zu Kontrollzellen. Die Fläche unter Kombination von DHPG (75µM) und U73122 (10µM) betrug 8079,3µm² und war damit signifikant kleiner

als bei der Kontrollkultur ($p < 0,0001$). Die Expansion lag bei $146,3\mu\text{m}$ und war ebenfalls signifikant kleiner im Vergleich zu Kontrollzellen ($p < 0,0001$). Die mittlere Verzweigungszahl betrug $11,00$ ($p < 0,0001$) und der Verzweigungsindex $13,61$ Verzweigungspunkte/ $1000\mu\text{m}^2$ ($p = 0,0086$). Diese Werte bedeuten keine signifikanten Änderungen im Vergleich zur Einzelbehandlung mit DHPG (s. Tab. 7 und Abb. 16). Die Einzelbehandlung mit U73122 ergab ebenfalls keine signifikanten Veränderungen zur Kontrollgruppe (Fläche $18796,5\mu\text{m}^2$; Expansion $213,1\mu\text{m}$; Verzweigungszahl $34,92$; Verzweigungsindex $18,67$ Verzweigungspunkte/ $1000\mu\text{m}^2$; $p = 0,4358$) (s. Tab. 8 und Abb. 16).

Die Kombinationsbehandlung mit DHPG und dem spezifischen IP3-Rezeptor Antagonisten Xestospongine zeigte Unterschiede zur Einzelbehandlung mit DHPG $75\mu\text{M}$. Bei gleichzeitiger Aktivierung von mGlu-Rezeptoren 1 und Hemmung intrazellulärer IP3-Rezeptoren über 10 DIV war die Dendritenarchitektur in Größe, Expansion und Verzweigung vergleichbar mit Kontrollzellen. Eine Einzelbehandlung mit Xestospongine über 10 DIV zeigte keine signifikanten morphologischen Unterschiede zu Kontrollzellen (s. Tab. 8 und Abb. 16). Die mittlere Fläche unter Kombinationsbehandlung betrug $18727,5\mu\text{m}^2$ ($p = 0,1291$). Die mittlere Expansion der Dendriten betrug $188\mu\text{m}$ ($p = 0,0464$). Die Verzweigungsanzahl lag bei $33,33$ ($p = 0,7726$) und der Verzweigungsindex bei $17,79$ Verzweigungspunkte/ $1000\mu\text{m}^2$ ($p = 0,4358$). Unter dieser Kombinationsbehandlung ließ sich also der mGlu-Rezeptor vermittelte Effekt signifikant blockieren (s. Tab. 7 und Abb. 16). Allerdings konnten diese Ergebnisse in weiteren Versuchen nicht vollständig reproduziert werden. Es ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse in verschiedenen Versuchsreihen. Entsprechend war die Standardabweichung dieser Versuchsreihe verhältnismäßig groß. Eine starke Streuung der Werte um den Mittelwert ist also anzunehmen.

Da eine Blockade von intrazellulären IP3-Rezeptoren den mGlu-Rezeptor vermittelten Effekt abschwächte, wurde versucht, die intrazellulären Konzentrationen von Inositolphosphaten zu beeinflussen, um eventuell über diesen Mechanismus den DHPG vermittelten Effekt zu blockieren. Hierzu wurde ein spezifischer Inhibitor für die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) verwendet - LY294002. In der Einzelbehandlung zeigten diese keine signifikanten Effekte auf die Dendritenmorphologie von Purkinjezellen (s. Tab. 8 und Abb. 16). In Kombination mit DHPG zeigte sich ebenfalls eine Abschwächung des DHPG vermittelten Effektes durch LY294002. Die Dendriten waren in Fläche ($18237,9\mu\text{m}^2$, $p = 0,0514$), Expansion ($179,47\mu\text{m}$, $p = 0,0006$), Verzweigung ($29,29$, $p = 0,1836$), und Verzweigungsindex ($16,40$ Verzweigungspunkte/ $1000\mu\text{m}^2$, $p = 0,1261$) mit denen von Kontrollkulturen vergleichbar.

Es bestanden lediglich leichte, signifikante Unterschiede hinsichtlich der Expansion der Dendriten (s. Tab. 7 und Abb. 16). Jedoch konnten auch diese Ergebnisse nicht vollständig reproduziert werden, so dass die Ergebnisse der beiden letzten Versuchsreihen mit gewisser Zurückhaltung interpretiert werden müssen.

Tab. 7: Ergebnisübersicht für 4.5.

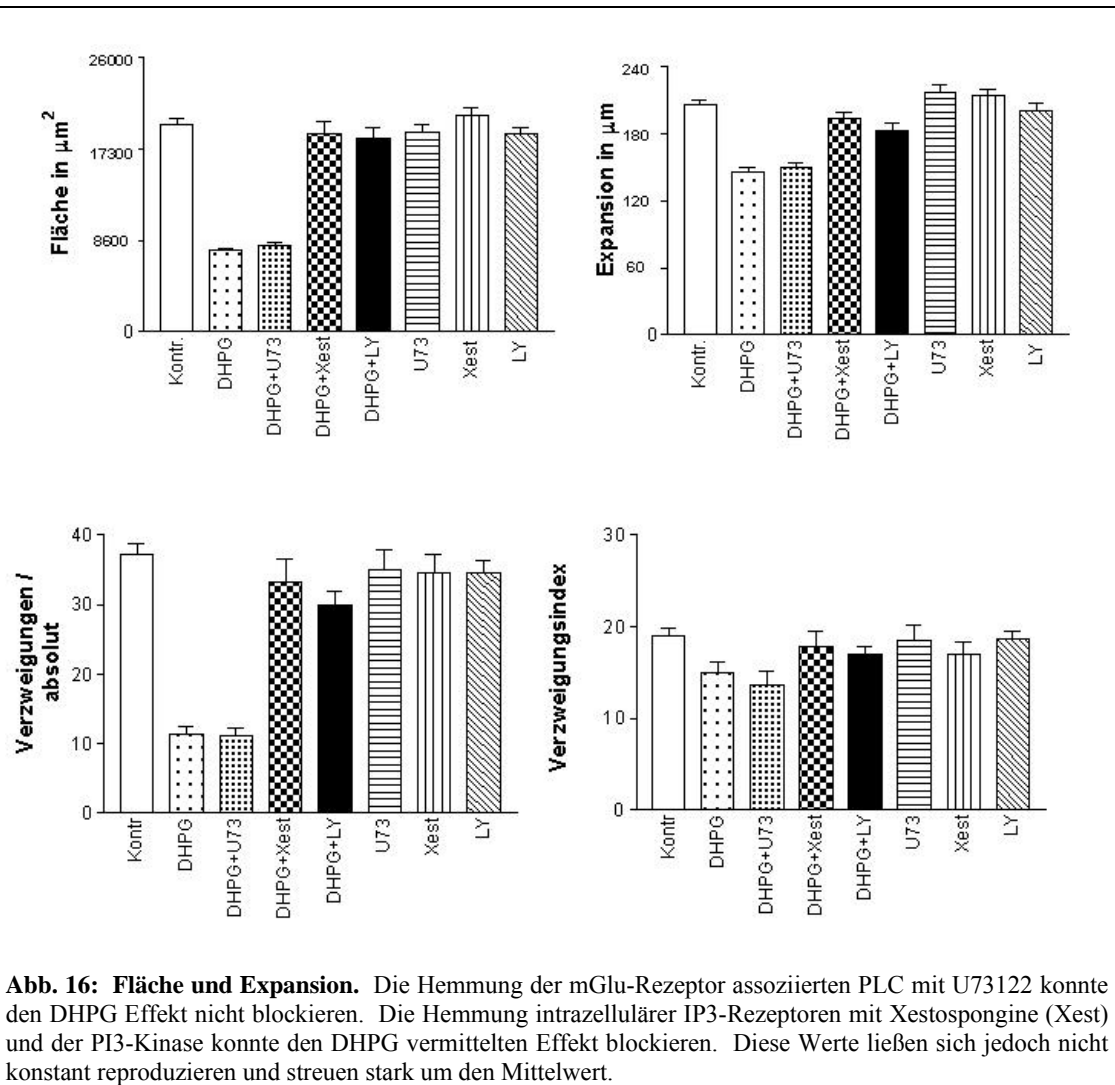
	<u>Behandlung</u>	<u>Kontrolle</u>	<u>DHPG</u>	<u>DHPG + U73122</u>	<u>DHPG + Xest</u>	<u>DHPG + LY294002</u>
Flä	Anzahl	193	171	73	54	53
	Mean	19593,0	7672,4	8079,3	18727,5	18237,9
	p-Wert		<0,0001***	<0,0001 ***	0,1291	0,0514
Expa	Anzahl	193	171	73	54	53
	Mean	202,5	143,0	146,3	188,0	179,5
	p-Wert		<0,0001***	<0,0001 ***	0,0464	0,0006
BP	Anzahl	20	20	20	20	20
	Mean	37,25	11,42	11,0	33,33	29,92
	p-Wert		<0,0001 ***	<0,0001 ***	0,0726	0,1836
BPI	Anzahl	20	20	20	20	20
	Mean	19,01	14,88	13,61	17,79	16,40
	p-Wert		0,0166 *	0,0086 **	0,4358	0,1261

Flächen (Flä) sind in der Einheit [μm^2] und Expansionen (Expa) in [μm] angegeben. Verzweigungen (BP) sind in absoluten Zahlen und Verzweigungsindizes (BPI) in Verzweigungen/1000 μm^2 angegeben. P-Werte gelten für den Vergleich mit Kontrollzellen.

Tab. 8: Ergebnisübersicht Einzelbehandlungen für 4.5.

	<u>Behandlung</u>	<u>Kontrolle</u>	<u>DHPG</u>	<u>U73122</u>	<u>Xest</u>	<u>LY294002</u>
Flä	Anzahl	193	171	56	61	58
	Mean	19593,0	7672,4	18796,5	20348,3	18627,6
	p-Wert		<0,0001***	0,4901	0,3219	0,3824
Expa	Anzahl	193	171	56	61	58
	Mean	202,5	143,0	213,1	209,3	196,9
	p-Wert		<0,0001***	0,1698	0,2311	0,3298
BP	Anzahl	20	20	20	20	20
	Mean	37,25	11,42	34,92	36,67	34,67
	p-Wert		<0,0001 ***	0,2145	0,9770	0,9080
BPI	Anzahl	20	20	20	20	20
	Mean	19,01	14,88	18,67	18,02	18,61
	p-Wert		0,0166 *	0,4358	0,0999	0,7950

Flächen (Flä) sind in der Einheit [μm^2] und Expansionen (Expa) in [μm] angegeben. Verzweigungen (BP) sind in absoluten Zahlen und Verzweigungsindizes (BPI) in Verzweigungen/1000 μm^2 angegeben. P-Werte gelten für den Vergleich mit Kontrollzellen.



6 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden an organotypischen Kleinhirnschnittkulturen molekulare Aspekte der Dendritenentwicklung von Purkinjezellen *in vitro* untersucht. Metzger und Kapfhammer (2000) demonstrierten an Kleinhirnschnittkulturen von Ratten, dass die Aktivierung der PKC bei der Dendritenentwicklung von Purkinjezellen eine wichtige Rolle spielt. Da die Aktivierung der PKC über second messenger nach mGlu-Rezeptor Stimulation bekannt ist, entwickelte sich die dieser Arbeit zu Grunde liegende Hypothese, dass die Aktivierung von mGlu-Rezeptoren einen Einfluss auf die Entwicklung von Purkinjezellendriten hat. Mit diesem Versuchsmodell sollte der Zusammenhang von mGlu-Rezeptor gekoppelten Signalwegen und der Dendritenentwicklung in Purkinjezellen untersucht werden. Mittels pharmakologischer Behandlung von Kleinhirnschnittkulturen und immunzytochemischer Färbung konnte demonstriert werden, dass die Aktivierung von mGlu-Rezeptoren *in vitro* zur Bildung von kleinen kurzen und in ihrer Verzweigung deutlich reduzierten Dendritenbäumen führte. Die Morphologie der Purkinjezellendritenbäume und die gemessenen Parameter der Dendritenausbreitung unter mGlu-Rezeptor Aktivierung waren vergleichbar mit den Ergebnissen nach Aktivierung der PKC (Metzger und Kapfhammer 2000). Die Hemmung der PKC-Aktivität durch pharmakologische Inhibitoren konnte den mGlu-Rezeptor vermittelten Effekt jedoch nicht blockieren. Auch eine Hemmung der mGlu-Rezeptor assoziierten PLC, die eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion dieses Rezeptors spielt, konnte den rezeptorvermittelten Effekt nicht blockieren. Gleichzeitig ist ein indirekter, über Körnerzellenaktivität vermittelter, mGlu-Rezeptor-Effekt anhand der vorliegenden Untersuchungen unwahrscheinlich. Die Blockierung intrazellulärer IP3 Rezeptoren, sowie eine Inhibierung der PI3-Kinase führten zu einer Blockade des mGlu-Rezeptor vermittelten Effektes. Eine Verifizierung dieser Ergebnisse gelang durch erneute Versuchsreihen bisher jedoch nicht.

6.1 *PURKINJEZELLEN IN VITRO*

Die Kleinhirnschnittkultur nach dem durch Stoppini et al. (1991) modifizierten Protokoll stellt ein geeignetes System zur morphologischen Untersuchung von Purkinjezellendriten dar. Da die Schnitte durch das präparierte Kleinhirn sagittal entlang der Ausrichtung der Purkinjezellendritenbäume verlaufen, ist es möglich die gesamten Zellen, inklusive ihrer Axone, darzustellen. Diese projizieren zu den Kleinhirnkernen welche im zentralen Bereich der Kulturen mit angeschnitten sind (Kapfhammer 2004). Während der Präparation werden alle extrazerebellären Afferenzen der Purkinjezellen durchtrennt. Auch Körnerzellaxone werden auf Grund ihres Verlaufes bei einer sagittalen Schnittführung

durchtrennt. Da sich die Körnerzellen im Präparationszeitraum jedoch noch in einem relativ frühen Entwicklungsstadium befinden, bilden sich im Verlauf der Kulturperiode neue Axone und Körnerzell-Purkinjezell-Verbindungen (Tanaka et al. 1994). Auch die intrazerebellären Interneurone sind in den Schnittkulturen vorhanden. Die Färbung der Purkinjezellen durch anti-Calbindin-Antikörper ist im Kleinhirn spezifisch für Purkinjezellen (Celio 1990). Außerdem kommt dieses Protein in der gesamten Zelle vor und erlaubt dadurch eine vollständige Anfärbung der Zelle einschließlich sämtlicher Fortsätze. Eine eingehende morphologische Untersuchung wird dadurch ermöglicht (Kapfhammer 2004). Das Vorhandensein neuraler Aktivität in Kleinhirnschnittkulturen trägt zur normalen Ausbildung der Purkinjezellendriten bei. Ihr Einfluss auf die Dendritenentwicklung an Purkinjezellen ist eingehend untersucht. In Schnittkulturen führt ein Wegfall der glutamatergen exzitatorischen Impulse nicht zu einer nachhaltigen Veränderung der Purkinjezellendritenmorphologie (Adcock et al. 2004). Bei der Untersuchung molekularer Aspekte der Dendritenentwicklung durch Behandlung der Schnittkulturen mit pharmakologisch aktiven Substanzen ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Abgrenzung direkter und indirekter, durch Interneurone vermittelter, Effekte schwierig sein kann. Hierauf wird im Weiteren noch eingegangen.

Wie in 4.1 beschrieben, weisen die Purkinjezellen nach fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen Vitalitätskriterien auf, zum Beispiel die Entwicklung ihres Dendritenbaums und synaptischer Dornen. Die Zellkörper liegen in einer Schicht des Kleinhirnkortex, die nach Färbung mit Calbindin D28K und NeuN als Purkinjezellschicht identifiziert werden kann (Adcock et al. 2004). Damit behalten sie in der Kleinhirnschnittkultur ihre physiologische Position im Kleinhirnkortex. Ihre Dendritenbäume breiten sich in einer Ebene oberhalb der Somata aus. Die Struktur, Komplexität und purkinjezelltypischen Charakteristika sind mit in vivo entwickelten Dendritenbäumen vergleichbar. Untersuchungen in denen Purkinjezellen in Kleinhirnschnittkulturen nach 1, 2, 3, 6 und 12 DIV fixiert, immunzytochemisch gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert wurden, zeigten, dass sich Purkinjezellendriten in vitro regelrecht entwickeln (Adcock et al. 2004). Sie zeigen zunächst eine Aussprossung primärer Dendriten, die sich im Folgenden weiter verzweigen, vergrößern und schließlich stabilisieren.

Auf Grund dieser Faktoren ist die Kultivierung von Purkinjezellen in organtypischen Kleinhirnschnittkulturen über 10 bis 12 DIV ein geeignetes Versuchsmodell zur Untersuchung der Dendritenentwicklung von Purkinjezellen.

6.2 EINFLUSS VON mGLU-REZEPTOREN AUF DIE DENDRITENENTWICKLUNG

Auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit kann davon ausgegangen werden, dass die Aktivierung von mGlu-Rezeptoren die Dendritenentwicklung hemmen kann. Nach Aktivierung dieser Rezeptoren resultieren kleine, kurze Dendritenbäume mit einer starken Reduzierung ihrer Verzweigungen. Der Effekt ähnelt dem Effekt den Metzger und Kapfhammer (2000) nach pharmakologischer Aktivierung der PKC in Kleinhirnschnittkulturen beobachteten.

6.2.1 Spezifität der Rezeptoraktivierung

Der Rezeptoragonist DHPG ist ein spezifischer Agonist für mGlu-Rezeptoren der Gruppe I, Subtyp 1 und 5. Da DHPG in niedrigen Konzentrationen eine höhere Affinität für mGlu-Rezeptoren des Subtyp 1 zeigt, wirkt er in der verwendeten Konzentration von 75µM hauptsächlich auf diesen Rezeptortyp. Weitere Untersuchungen im Labor von J. Kapfhammer haben gezeigt, dass der DHPG Effekt durch MPEP (2-Methhyl-6-phenylethynyl)pyridine hydrochloride), einen spezifischen Antagonisten am mGlu-Rezeptor 5, nicht blockiert werden kann. Dieses Ergebnis steht auch im Einklang mit Untersuchungen an Purkinjezellkulturen, in denen eine mGlu-Rezeptor 5-Expression in Körnerzellen, aber nicht in Purkinjezellen nachgewiesen werden konnte (Catania et al. 2001).

Das gewählte Versuchsmodell der Kleinhirnschnittkultur birgt das Problem, dass es sehr anfällig für Störungen physikalischer oder chemischer Natur ist. Dies erforderte eine sorgfältige Behandlung und genaue Titrierung der Substanzen, da die pharmakologischen Fenster, in denen gearbeitet wurde, relativ klein waren. Insbesondere hat die starke Aktivierung von mGlu-Rezeptoren eine exzitotoxische Wirkung (Camon et al. 1998), die von den uns interessierenden Wirkungen auf die Dendritenmorphologie abgegrenzt werden musste. Ein toxischer Effekt des mGlu-Rezeptor Agonisten DHPG auf die Purkinjezellen ließ sich zunächst nicht ausschließen. Insbesondere konnte festgestellt werden, dass hohe Konzentrationen an DHPG eine deutliche Zellzahlreduzierung hervorriefen, somit offenbar eine exzitotoxische Wirkung hatten. Vorhandene Zellen zeigten bei einer Konzentration von 100µM und höher nahezu keine Dendriten, während bei der verwendeten Konzentration von 75µM die Zellzahl weitgehend normal war und sich Dendriten mit der oben beschriebenen Morphologie entwickelten. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass DHPG in einer Konzentration von 75µM eine Wirksamkeit auf die Dendritenentwicklung von Purkinjezellen zeigt, ohne gleichzeitig eine starke exzitotoxische Wirkung auszuüben. Von Bedeutung ist die Tatsache, dass sich der DHPG vermittelte Effekt durch den spezifischen mGlu-Rezeptor Antagonisten MCPG vollständig blockieren ließ. Der DHPG-vermittelte Effekt ist daher als spezifisch und rezeptorvermittelt zu interpretieren. Dass die

intrazellulären Signalvorgänge bei stärkerer Stimulierung der mGlu-Rezeptoren 1 letztendlich zum exzitotoxischen Tod der Purkinjezellen führen können ist als wahrscheinlich anzusehen. Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Untersuchungen wurden aber bei niedriger, nicht exzitotoxisch wirksamer DHPG-Konzentration und bei intakten Purkinjezellen durchgeführt.

6.2.2 mGlu-Rezeptor1 und Dendritenentwicklung

Der Einfluss synaptischer Aktivität auf die Dendritenentwicklung wurde in den vergangenen Jahren eingehend untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass Exzitation vorwiegend fördernd auf die Dendritenentwicklung wirkt und eine Hemmung der synaptischen Aktivität einen hemmenden Einfluss auf die Dendritenentwicklung ausübt. Der Einfluss mGlu-Rezeptoren 1 an postsynaptischen Potentialen wurde von Knöpfel et al. (2000) eingehender untersucht. Diese Untersuchungen zeigten, dass die Aktivierung von postsynaptischen mGlu-Rezeptoren 1 an Purkinjezellen, durch tetanische Parallelfaser- oder Kletterfaserstimulation, langsame exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSPs) auslösen kann. Sie gehen mit einer Erhöhung der intrazellulären Kalzium Konzentration einher. Diese EPSPs und intrazellulären Kalzium Anstiege ließen sich auch über den mGlu-Rezeptor 1 Agonisten DHPG auslösen. Eine Beteiligung von mGlu-Rezeptoren 1 sowohl an schnellen exzitatorischen Signalen als auch an langsamen, second messenger vermittelten, strukturellen Anpassungen der Zelle ist daher denkbar. Shigemoto et al. (1994) zeigte, dass mGlu-Rezeptoren 1 der distalen Dendriten an der LTD beteiligt sind. Ein entwicklungsfördernder Einfluss über mGlu-Rezeptoren 1 vermittelte Signale ist durch diese Untersuchungen anzunehmen. Eine Aktivierung von mGlu-Rezeptoren 1 im untersuchten Modell hatte jedoch einen hemmenden und nicht, wie nach oben genannten Untersuchungen vielleicht anzunehmenden, fördernden Effekt auf die Dendritenentwicklung. Die fördernde Wirkung der synaptischen Aktivität lässt sich hauptsächlich auf die Aktivierung von ionotropen Glu-Rezeptoren des NMDA und AMPA Typs zurückführen, die schnelle, natriumvermittelte postsynaptische Potentiale hervorrufen können (Rajan und Cline et al. 1998). In einem Kulturexperiment wurde der fördernde Einfluss der NMDA-Rezeptor Aktivierung, über NMDA-Rezeptoren der Körnerzellen mit anschließender Freisetzung des neurotrophen Faktors BDNF, dargestellt (Hirai und Launey 2000). Eine negative Rückkopplung der synaptischen Aktivität über mGlu-Rezeptor Aktivierung konnte für Kletterfaser-Purkinjezell-Synapsen beschrieben werden. Hier führte eine Aktivierung von mGlu-Rezeptoren an Purkinjezellen über Kletterfasern zur Generierung eines retrograden Signals an Cannabinoidrezeptoren der Kletterfasern, was eine Reduktion der Glutamat Freisetzung aus Kletterfasern zur Folge hatte (Maejima et al. 2001). Eine solche über Cannabinoidrezeptoren vermittelte Reduktion der synaptischen

Aktivität könnte einen hemmenden Einfluss auf die Dendritenentwicklung nach mGlu-Rezeptor Aktivierung unterstützen. Jedoch sind Kletterfaser-Purkinjezell-Synapsen im vorliegenden Versuchsmodell nicht vorhanden, da der Olivenkernkomplex, dem die Kletterfasern entstammen, bei der Präparation der Kleinhirnschnittkulturen entfernt wurde.

Eine hemmende Wirkung synaptischer Aktivität auf die Dendritenentwicklung ließe sich auch mit einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration erklären, die direkt ein wachstumshemmendes Signal sein kann oder ein solches über die Aktivierung bestimmter Enzyme (z.B. der PKC) vermitteln könnte. Solche Phänomene wurden bereits für Neurone des visuellen Kortex nach mGlu-Rezeptor Blockade und Blockade von L-Typ Kalzium Kanälen beschrieben (McAllister 2000). Diese Untersuchungen legten auch nahe, dass eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, wie sie nach Aktivierung mGlu-Rezeptoren stattfindet, einen hemmenden Einfluss auf die Dendritenentwicklung haben kann. Diese Theorie ließe sich am vorliegenden Modell überprüfen, in dem man die intrazelluläre Kalziumfreisetzung nach mGlu-Rezeptor Aktivierung hemmt oder in dem man intrazellulär freigesetztes Kalzium durch Puffersysteme abzupuffern versucht. Letzteres ist jedoch für das gewählte Versuchsmodell schwierig zu verwirklichen, da dieses Modell sehr empfindlich auf Veränderungen der Kalziumhomöostase reagiert. Die Hemmung der intrazellulären Kalziumfreisetzung aus dem glatten endoplasmatischen Retikulum wurde mit einem spezifischen IP3-Rezeptor Antagonisten vorgenommen und wird in Kapitel 6.5.2 diskutiert.

6.3 ZUSAMMENHANG MGLU-REZEPTOR UND PKC

Der Effekt der mGlu-Rezeptoren 1 Aktivierung auf die Dendritenentwicklung von Purkinjezellen ähnelt dem von Metzger und Kapfhammer (2000) beschriebenen Effekt nach Aktivierung der PKC in Purkinjezellen. In weiteren Untersuchungen konnten Metzger und Kapfhammer (2001) zeigen, dass unterschiedliche Subtypen der PKC diesen Effekt vermitteln können. Bei PKC γ defizienten Mäusen zeigten sich in vitro deutlich größere Dendritenbäume als bei Kontrollkulturen, wobei auch bei diesen Tieren die Dendritenentwicklung nach PKC Aktivierung gehemmt wurde. Einen fördernden Effekt der PKC-Hemmung auf die Dendritenentwicklung und das Zellüberleben in Kleinhirnschnittkulturen beschreibt auch Ghomari et al. (2002). Ein Einfluss von Proteinkinasen auf die Dendritenentwicklung ist nahe liegend, da sie eine große Anzahl von Proteinen phosphorylieren, die an synaptischer Plastizität und der Regulierung des Zytoskeletts beteiligt sind. Nach Kenntnis der mGlu-Rezeptor-gekoppelten Signalwege ist die Aktivierung der PKC durch die mGlu-Rezeptoren wahrscheinlich. Die morphologische Ähnlichkeit des von Metzger und Kapfhammer beobachteten Effektes mit den hier

dargestellten Ergebnissen unterstützt die Hypothese, dass der Effekt der Aktivierung von mGlu-Rezeptoren über die PKC vermittelt ist. Jedoch kann diese Annahme anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. Der durch DHPG vermittelte Effekt konnte durch Hemmung der PKC, mit den spezifischen Inhibitoren GFX und Cheleretrine, nicht blockiert werden. Die Wirksamkeit der PKC Inhibitoren ist dadurch als wahrscheinlich anzunehmen, dass sie in vergleichbaren Konzentrationen ihre typischen Effekte auf die Dendritenentwicklung ausüben. Weiterhin sind beide Substanzen PKC Inhibitoren welche die klassischen, kalziumabhängigen Subtypen dieser Proteinkinase hemmen. Eine Vermittlung der Wirkung via untypische PKC-Isoformen kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass mGlu-Rezeptor Effekte sicher nicht ausschließlich über die PKC vermittelt werden können, sondern dass zusätzlich weitere, durch die verwendeten Inhibitoren nicht erfasste Signalübertragungswege beteiligt sein müssen. Es ist denkbar und wahrscheinlich, dass mGlu-Rezeptor Effekte auf die Dendritenentwicklung über mehrere verschiedene Signalwege vermittelt werden.

6.4 KÖRNERZELLEFFEKT AUF PURKINJEZELLDENDRITENENTWICKLUNG

Da mGlu-Rezeptoren auch an Körnerzellen auftreten, hätte der unter DHPG Behandlung beobachtete Effekt auf die Dendritenentwicklung von Purkinjezellen indirekt über Körnerzellen vermittelt sein können. Körnerzellen vermitteln ihre Information über den exzitatorischen Transmitter Glutamat an Purkinjezellen (Ito 2002). Daher stehen zwei Möglichkeiten eines über DHPG vermittelten Körnerzelleffektes auf die Dendritenentwicklung von Purkinjezellen zur Verfügung. Entweder wird dieser Effekt ebenfalls über mGlu-Rezeptoren vermittelt. In diesem Falle würde dieser Rezeptor aber genauso durch DHPG aktiviert werden und ein eventueller indirekter Effekt durch Körnerzellen wäre für die Auswertung der Ergebnisse in diesem Falle irrelevant. Oder es liegt ein indirekter Effekt über iGlu-Rezeptoren, wie zum Beispiel NMDA- und AMPA-Rezeptoren, vor, auch wenn die Aktivierung dieser Rezeptoren meist einen positiven Effekt auf die Dendritenentwicklung hatte (Rajan und Cline 1998). Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden die Kulturen in Kombination mit DHPG und den spezifischen Rezeptorantagonisten für AMPA/Kainat-Rezeptoren (CNQX) und NMDA-Rezeptoren (APV) behandelt. Zusätzlich wurde die Fortleitung von Aktionspotentialen via Natrium-Kanäle durch TTX blockiert. Die Kombinationsbehandlung dieser Substanzen mit DHPG konnte den DHPG-Effekt nicht blockieren. Ein indirekter Körnerzell-vermittelter Effekt über iGlu-Rezeptoren oder Natrium ist nach diesen Ergebnissen unwahrscheinlich. Die

Behandlung mit den Einzelsubstanzen CNQX, APV und TTX zeigte, wie bereits bekannt, keine Effekte auf die Dendritenentwicklung (Adcock et al. 2004).

6.5 REZEPTORGEKOPPELTE SIGNALWEGE UND DENDRITENENTWICKLUNG

6.5.1 Dendritenentwicklung und PLC

Da die Inhibierung der PKC keine vollständige Blockade des mGlu-Rezeptor vermittelten Effektes herbeiführen konnte, stellt sich die Frage, welche weiteren Signalwege an der Vermittlung der Rezeptoraktivierung beteiligt sein könnten. Dazu wurde versucht die einzelnen „Stationen“ des mGlu-Rezeptor 1 assoziierten Signalwegs zu beeinflussen. Die Phospholipase C wurde mit dem spezifischen Inhibitor U73122 gehemmt. Dieses Enzym wird von dem rezeptorgekoppelten G-Protein aktiviert und spaltet das membranständige Phosphatidylinositol-2-Phosphat unter Phosphorylierung zum löslichen Botenstoff Inositol-3-Phosphat (IP3) und dem membranständigen Diacylglycerol (DAG). Die Hemmung dieses Enzyms mit dem selektiven PLC-Hemmstoff U73122 konnte den mGlu-Rezeptor vermittelten Effekt nicht blockieren. Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass nicht nur ein Signalweg an der Vermittlung dieses mGlu-Rezeptor Effektes beteiligt ist, sondern dass PLC-unabhängige Signale diese Effekte vermitteln können. Im Versuchsaufbau wurden die genauen Behandlungsdosen so eingestellt, dass keine toxischen Effekte auf die Zellentwicklung erkennbar waren und sich die verwendete Dosis (10 μ M) deutlich oberhalb der in der Literatur angegebenen ED 50 (Effektivdosis 50) und auch oberhalb der in anderen Studien verwendeten Konzentrationen befand. Die Möglichkeit, dass der verwendete Inhibitor in unserer Studie nicht aktiv war, kann zwar nicht völlig ausgeschlossen werden, ist aber als unwahrscheinlich anzunehmen.

6.5.2 Dendritenentwicklung und PLC-unabhängige rezeptorassoziierte Signale

Andere PLC-unabhängige Signalwege könnten ihre Effekte eventuell über die direkte Freisetzung intrazellulären Kalziums vermitteln. Die Rolle des Kalziums bei der Dendritenentwicklung ist in einigen Untersuchungen beschrieben worden. Wong und Wong (2000) konnten zeigen, dass eine erhöhte Kalziumkonzentration einen positiven Effekt auf die Filopodienmotilität der Dendriten hat. Filopodien sind sehr dynamische Strukturen die während der Dendritenentwicklung auftreten. Bisher ist jedoch nicht geklärt, ob eine verstärkte Filopodienmotilität als Indikator für einen positiven Einfluss verschiedener Signale auf die Dendritenentwicklung gelten kann. Die Rolle der IP3-abhängigen kalziuminduzierten Kalziumfreisetzung (ICICR) war Grundlage verschiedener Untersuchungen deren Ergebnisse Barbara (2002) zusammenfasste. Aus diesen Studien wird deutlich, dass ICICR an verschiedenen Modellen der synaptischen Plastizität beteiligt

ist. Damit ist es auch gut vorstellbar, dass ICICR eine Rolle bei der Steuerung der Dendritenentwicklung spielt. Es wurde in den von Barbara (2002) genannten Untersuchungen ein positiver Effekt auf die synaptische Plastizität durch Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration beschrieben. Dies würde eine These der Förderung der Dendritenentwicklung durch eine Steigerung der intrazellulären Kalziumkonzentration unterstützen. Die dieser Arbeit zu Grunde liegende Hypothese einer Hemmung der Dendritenentwicklung durch Freisetzung intrazellulären Kalziums steht zunächst im Widerspruch zu diesen Überlegungen. Es wäre jedoch denkbar, dass geringe Steigerungen der Kalziumkonzentration die bei der ICICR erwartete positive Wirkung auf die Dendritenentwicklung haben und die Hemmung der Dendritenentwicklung erst bei starker, langanhaltender Steigerung der Kalziumkonzentration einsetzt. Ein hemmender Einfluss auf die Dendritenentwicklung durch intrazellulär freigesetztes Kalzium wurde von Cline (2001) und von McAllister (2000) beschrieben. Cline beschreibt die Beteiligung kalziumabhängiger Enzyme wie der Kalzium-Calmodulinkinase II (CamKII) an der Hemmung des Dendritenwachstums in reifen Nervenzellen. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass intrazellulär freigesetztes Kalzium als Stoppsignal während der Dendritenentwicklung fungieren kann und seinen Effekt über kalziumbindende Proteine wie der CamKII vermittelt. An dieser Stelle wäre auch die Beteiligung der ebenfalls kalziumabhängigen PKC denkbar. Ein möglicher Signalweg wäre folgender: Nach Bildung funktioneller Synapsen kommt es an diesen Stellen über synaptische mGlu-Rezeptor Aktivierung zur ICICR und einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, dies führt im Weiteren zu einer Aktivierung kalziumabhängiger Proteinkinasen die ihrerseits als Stoppsignal für die Dendritenentwicklung fungieren. Eine so vermittelte Hemmung der Dendritenentwicklung über mGlu-Rezeptoren könnte durch die vorliegenden Ergebnisse unterstützt werden. Diese müssten dann als eine pharmakologische, früh einsetzende und starke Aktivierung eines während der in vivo Entwicklung erst im Verlaufe zunehmend aktivierten Stoppsignals verstanden werden. Um diese Hypothese zu untersuchen wurde eine Blockade des am endoplasmatischen Retikulum (ER) befindlichen IP3 Rezeptors mit Xestospongine vorgenommen. Dies würde zu einer Hemmung der Kalzium-Freisetzung aus dem ER führen. Unter der kombinierten Behandlung mit DHPG und Xestospongine ließ sich der DHPG vermittelte Effekt in mehreren Experimenten vollständig durch Xestospongine blockieren. Dieses Ergebnis ließ sich leider in weiteren Versuchen nicht vollständig reproduzieren. Außerdem zeigte sich bei der Auswertung der Versuche, in denen Xestospongine wirksam war, eine deutliche Streuung der Ergebnisse von knapp 2000 μm^2 in bezug auf die Fläche. Außerdem hatte diese Behandlung keinen hemmenden Einfluss auf die durch DHPG vermittelte Reduktion der Expansion. Im Moment ist nicht klar, ob die nicht vollständig konsistenten Ergebnisse durch unterschiedliche Aktivität des

kommerziell erhältlichen Xestospongines zu erklären sind oder ob die erfolgreiche Blockade durch andere, Xestospongine-unabhängige Mechanismen, bewirkt wurde. Es ist deshalb im Moment nicht möglich eine eindeutige Bewertung der Rolle des IP3-Rezeptors für die Dendritenentwicklung abzugeben. Es ist aber denkbar und wahrscheinlich, dass er bei der Vermittlung des mGlu-Rezeptor Effekts eine Rolle spielt.

Ebenso wie Xestospongine konnte in einigen Experimenten die Inhibierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) durch LY294002 den DHPG vermittelten Effekt blockieren. Diese Ergebnisse eröffneten neue Fragen. Eine Beteiligung unterschiedlicher Signalwege an der Dendritenentwicklung nach mGlu-Rezeptor Aktivierung wurde bereits angenommen, jedoch ist die Beteiligung der PI3-Kinase an Signalwegen der mGlu-Rezeptoren noch nicht eindeutig geklärt. Die Aktivierung der PI3-Kinase wurde hauptsächlich im Zusammenhang mit Östrogenrezeptoren oder anderen tyrosinkinasegekoppelten Rezeptoren beschrieben. Dabei wurde die Wirkung der PI3-Kinase auf das Zellüberleben untersucht. Dolcet et al. (2001) und Philpott et al. (1997) konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass eine Aktivierung der PI3-Kinase über Zytokine, Insulin-like-growth-Faktor-1 (IGF-1) oder NGF das Zellüberleben fördern. Ein IGF-1 vermittelter positiver Effekt auf das Zellüberleben von Purkinjezellen wurde von Trejo et al. (2000) beschrieben. Honda et al. (2000) zeigte, dass ein Glutamat vermittelter Zelltod durch die Aktivierung der PI3-Kinase über Östrogene gehemmt werden kann. Alle diese Untersuchungen verdeutlichen den positiven Effekt der PI3-Kinase-Aktivierung auf das Zellüberleben, der die zunächst beobachteten Effekte unterstützen könnte. Eine spezifische Wirkung der PI3-Kinase auf die Dendritenentwicklung wurde bisher nicht beschrieben. Vanhaesebroeck und Waterfield (1999) beschrieben in ihren Untersuchungen, dass eine Aktivierung der PI3-Kinase über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stattfindet. Hierbei wird die PI3-Kinase über die β/γ -Untereinheit der G-Proteine aktiviert. Eine Aktivierung der PI3-Kinase über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurde für die Klasse I und II PI3-Kinasen beschrieben. Shin et al. (1998) zeigte, dass alle bekannten Untereinheiten der PI3-Kinasen in Purkinjezellen exprimiert werden. Die Expression ist ein Hinweis darauf, dass diese Proteinkinase eine Rolle bei der Signaltransduktion in diesen Zellen spielen könnte. Die PI3-Kinase beeinflusst unter anderem kleine GTPasen der Rho-Familie, die bekannte Regulatoren des Zytoskeletts sind. Die Regulation des Zytoskeletts ist sicherlich eine wichtige Komponente der Dendritenentwicklung. Li et al. (2000) konnte demonstrieren, dass die Aktivierung von RhoA über NMDA-Rezeptoren einen hemmenden Einfluss auf die Dendritenentwicklung hat. Eine ähnliche mGlu-Rezeptoren vermittelte RhoA Aktivierung via PI3-Kinase könnte einen hemmenden Einfluss der PI3-Kinase auf die Dendritenentwicklung erklären. Allerdings war es auch bei der Behandlung mit LY294002 so, dass die positiven

Ergebnisse der anfänglichen Testreihen sich in weiteren Experimenten nicht vollständig reproduzieren ließen. Außerdem zeigte sich in der Kombinationsbehandlung von DHPG mit LY294002 kein positiver Effekt auf die Reduktion der Expansion nach Einzelbehandlung mit DHPG. Dabei ist nicht klar, ob die teilweise unterschiedlichen Ergebnisse durch unterschiedliche Aktivität des kommerziell erhältlichen LY294002 zu erklären sind. Daher müssen auch diese Ergebnisse mit gewisser Vorsicht interpretiert werden. Ein spezifischer Effekt über die Hemmung der PI3-Kinase nach mGlu-Rezeptor 1 Aktivierung kann im Moment noch nicht als gesichert angenommen werden.

7 SCHLUSSFOLGERUNG

Metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe 1 können nach ihrer Aktivierung die Dendritenentwicklung von Purkinjezellen in vitro hemmen. Die Dendritenmorphologie nach mGlu-Rezeptor Aktivierung ähnelt der Dendritenmorphologie nach Aktivierung der Proteinkinase C in Purkinjezellen. Eine Aktivierung der PKC über mGlu-Rezeptoren ist nach Kenntnis der rezeptorgekoppelten Signalwege nahe liegend, konnte aber anhand der vorliegenden Versuchsergebnisse nicht bestätigt werden. Vielmehr scheint der mGlu-Rezeptor Effekt über mehrere Signalwege vermittelt zu werden. Die Beteiligung der PKC an einem dieser Signalwege ist weiterhin denkbar. Eine indirekt vermittelte Wirkung von Glutamat nach mGlu-Rezeptor 1 Aktivierung über Körnerzellen ist nach den vorliegenden Ergebnissen unwahrscheinlich. Die Hypothese, dass mGlu-Rezeptor 1 vermittelte Effekte nicht ausschließlich über den mGlu-Rezeptor-PKC-Signalweg vermittelt sind, wird außerdem dadurch unterstützt, dass eine Hemmung der PLC den mGlu-Rezeptor Effekt nicht blockieren konnte. Bei der Suche nach anderen Signalwegen, die diesen Effekt vermitteln könnten, konnten keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. Aus dieser Arbeit ergaben sich erste Hinweise auf eine Beteiligung von IP₃, beziehungsweise intrazellulären IP₃-Rezeptoren und der Phosphatidylinositol 3-Kinase. Die Möglichkeit einer Beteiligung dieser Signalwege an der mGlu-Rezeptorwirkung wird im Moment im Labor von Prof. Kapfhammer weiter untersucht. Es bleibt deshalb im Moment noch offen, über welchen Signalweg der mGlu-Rezeptor 1 seinen Effekt auf die Dendritenentwicklung ausübt und in welcher Weise diese Signalweg(e) mit der PKC verknüpft sind. Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte jedoch ein weiterer Teil der molekularen Mechanismen der Dendritenentwicklung von Purkinjezellen in vitro beleuchtet werden und es konnten neue Erkenntnisse zum weiteren Verständnis dieser Phänomene gewonnen werden.

8 LITERATURANGABEN

- Abe T, Sugihara H, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N and Nakanishi S. 1992. Molecular characterization of an novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/ Ca^{2+} signal transduction. *J. Biol. Chem.* 267:13361-13368.
- Adcock KH, Metzger F and Kapfhammer JP. 2004. Purkinje cell dendritic tree development in the absence of excitatory neurotransmissions and of brain-derived neurotrophic factor in organotypic slice cultures. *Neuroscience* 127:137-145.
- Altmann J. 1972. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phase in the maturation of the Purkinje cells and of the molecular layer. *J. Comp. Neurol.* 145:399-463.
- Altmann J and Anderson WJ. 1972. Experimental reorganization of the cerebellar cortex. I. Morphological effects of elimination of all microneurons with prolonged x-irradiation started at birth. *J. Comp. Neurol.* 146:355-406.
- Altmann J and Bayer SA. 1978. Prenatal development of the cerebellar System in the rat. I. Cytogenesis and histogenesis of the deep nuclei and the cortex of the cerebellum. *J. Comp. Neur.* 179: 23-48.
- Asanuma C, Thach WT, Jones EG. 1983. Distribution of cerebellar terminations and their relation to other afferent terminations in the ventrolateral thalamic region of the monkey. *Brain Res. Rev.* 5: 237 – 265.
- Barbara JP. 2002. IP₃-dependent calcium-induced calcium release mediates bidirectional calcium waves in neurones: functional implications for synaptic plasticity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1600:12-18.
- Bayer SA and Altmann J: The rat nervous system. Academic Press, Inc. New York.1995.
- Benes FM, Parks TN and Rubel EW. 1977. Rapid dendritic atrophy following deafferentation: an EM morphometric analysis. *Brain Res.* 122:1-13.
- Catania MV, Bellomo M, Di Giorgi-Gerevini V, Seminara G, Giuffrida R, Romeo R, De Blasi A and Nicoletti F. 2001. Endogenous activation of group-I metabotropic glutamate receptors is required for differentiation and survival of cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 21: 7664-7673.
- Camon L, Vives P, de Vera N and Martinez E. 1998. Seizures and neuronal damage induced in the rat by activation of group I metabotropic glutamate receptors with their selective agonist 3,5-dihydroxyphenylglycine. *J. Neurosci. Res.* 51: 339 - 348

-
- Cantrell DA. 2001. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J. Cell Science* 114: 1439-1445.
- Celio MR. 1990. Calbindin D-28K and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35:375-475.
- Cantley L. 2002. The Phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Science* 296: 1655 - 1657
- Cline HT. 2001. Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11:118-126.
- Dailey ME and Smith SJ. 1996. The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J. Neurosci.* 16:2983-2994.
- Deitch JS and Rubel EW. 1984. Afferent influences on brain stem auditory nuclei of the chicken: the time course and specificity of dendritic atrophy following deafferentation. *J. Comp. Neurol.* 229:66-79.
- Dolcet X, Soler RM, Gould TW, Egea J, Oppenheim RW and Comella JX. 2001. Cytokines promote motoneuron survival through the Janus kinase-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol. Cell. Neurosci.* 18:619-631.
- Dunaevsky A, Tashiro A, Majewska A, Mason C and Yuste R. 1999. Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13438 – 13443.
- Eisenmann LM, Schalekamp MP and Voogd J. 1991. Development of the cerebellar cortical efferent projection: an in vitro anterograde tracing study in rat brain slices. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 60 :201-206.
- Engert F and Bonhoeffer T. 1999. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term plasticity. *Nature* 399:66-70.
- Fiala JC, Feinberg M, Popov V and Harris KM. 1998. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J. Neurosci.* 18:8900-8911.
- Ghoumari AM, Wehrle R, De Zeeuw CI, Sotelo C and Dusart I. 2002. Inhibition of Protein kinase C prevents Purkinje cell death but does not affect axonal regeneration. *J. Neurosci.* 22:3531-3542
- Gehz C: The cerebellum. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (eds.) *Principles of Neural Science*, pp 626-646. Elsevier, New York – Amsterdam. 2002.

-
- Göthe S, Wang Z, Ng L, Kindblom JM, Barros AC, Ohlsson C, Vennstrom B and Forrest D. 1999. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes Dev.* 13:1329-1341.
- Goossens J, Daniel H, Rancillac A, van der Steen J, Oberdick J, Crepel F, De Zeeuw CI and Frens MA. 2001. Expression of protein kinase C inhibitor blocks cerebellar long-term depression without affecting Purkinje cell excitability in alert mice. *J. Neurosci.* 21: 5813-5823.
- Harris KM. 1999. Structure, development and plasticity of dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9:343-348.
- Hashimoto K, Watanabe M, Kurihara H, Offermanns S, Jiang H, Wu Y, Jun K, Shin HS, Inoue Y, Wu D, Simon MI and Kano M. 2000. Climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development requires signal transduction involving Gαq and phospholipase Cβ4. *Prog. Brain Res.* 124:31-48.
- Hashimoto K, Curty FH, Borges PP, Lee CE, Abel ED, Elmquist JK, Cohen RN and Wondisford FE. 2001. An unliganded thyroid hormone receptor causes severe neurological dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3998-4003.
- Hirai H. 2001. Modification of AMPA receptor clustering regulates cerebellar synaptic plasticity. *Neurosci. Res.* 39: 261-267.
- Hirai H and Launey T. 2000. The regulatory connection between the activity of granule cell NMDA receptors and dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 20: 5217-5224.
- Hollmann M and Heinemann S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* 17:31-108.
- Horch HW, Kruttgen A, Portbury SD and Katz LC. 1999. Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF. *Neuron* 23:353-364.
- Ichise T, Kano M, Hashimoto K, Yanagihara D, Nakao K, Shigemoto R, Katsuki M and Aiba A. 2000. mGluR1 in cerebellar Purkinje cells essential for long-term depression, synapse elimination, and motor coordination. *Science* 288:1832-1835.
- Ito M. 2002. Controller-regulator model of the central nervous system. *J. Integr. Neurosci.* 1: 129-1943.
- Kapfhammer JP. 2004. Cellular and molecular control of dendritic growth and development of cerebellar Purkinje cells. *Progr. Histochem. Cytochem.* 39:131-184.

-
- Knöpfel T, Audinat E and Gähwiler BH. 1990. Climbing fibre responses in olivo-cerebellar slice cultures. I. Microelectrode recordings from Purkinje cells. *Eur. J. Neurosci.* 3:343-348.
- Knöpfel T and Grandes P. 2002. Metabotropic glutamate receptors in the cerebellum with a focus on their function in Purkinje cells. *Cerebellum* 1: 19 – 26.
- Koester SE and O'Leary DD. 1992. Functional classes of cortical projection neurons develop dendritic distinctions by class-specific sculpting of an early common pattern. *J. Neurosci.* 12:1382-1393.
- Larkfors L, Lindsey RM and Alderson RF. 1996. Charakterization of the responses of Purkinje cells to neutrophin treatment. *J. Neurochem.* 66:1362-1373.
- Li Z, Van Aelst L and Cline HT. 2000. Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbour growth in *Xenopus* central neurons in vivo. *Nature Neurosci.* 3:217-225.
- Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Lujan R and Juiz JM. 2001. Developmental changes in the localisation of the GluR1alpha subtype of metabotropic glutamate receptors in Purkinje cells. *Neuroscience* 105: 413 – 429.
- Maejima T, Hashimoto K, Yoshida T, Aiba A and Kano M. 2001. Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron* 31: 463 – 475.
- Mason CA, Christakos S and Catalano SM. 1990. Early climbing fiber interactions with Purkinje cells in the postnatal mouse cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 297:77-90.
- McAllister AK. 2000. Celular and molecular mechanisms of dendritic growth. *Cereb. Cortex* 10: 963-973.
- McAllister AK, Katz LC and Lo DC. 1999. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Ann. Rev. Neurosci.* 22:295-318.
- McAllister AK, Katz LC and Lo DC. 1996. Neutrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron* 17:1057-1064.
- McKinney RA, Capogna M, Durr R, Gähwiler and Thompson SM. 1999. Miniature synaptic events maintain dendritic spines via AMPA receptor activation. *Nature Neurosci.* 2:44-49.
- Metzger F and Kapfhammer JP. 2003. Protein kinase C: its role in activity dependent Purkinje cell dendritic development and plasticity. *Cerebellum* 2:206-214.

-
- Metzger F and Kapfhammer JP. 2000. Protein kinase C activity modulates dendritic differentiation of rat Purkinje cells in cerebellar slice cultures. *Eur. J. Neurosci.* 12:1993-2005.
- Morrison ME and Mason CA. 1998. Granule neuron regulation of Purkinje cell development: striking a balance between Neurotrophine and glutamate signaling. *J. Neurosci.* 18:3563-3573.
- Mount HT, Dreyfus CF and Black IB. 1994. Muscarinic stimulation promotes cultured Purkinje cells survival: a role for acetylcholine in cerebellar development? *J. Neurochem.* 63:2065-2073.
- Nakanishi S. 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597-603.
- Nicholson JL and Altman J. 1972. The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of the rat cerebellar cortex. II. Synaptogenesis in the molecular layer. *Brain Res.* 44:25-36.
- Ozawa S, Haruyuki K and Keisuke T. 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54:581-618.
- Philpott KL, McCarthy MJ, Klippel A and Rubin LL. 1997. Activated phosphatidylinositol 3-kinase and Akt kinase promote survival of superior cervical neurons. *J. Cell. Biol.* 139:809-815.
- Pin J-P and Duvoisin R. 1995. Review: Neurotransmitter receptors I, The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1-26.
- Rajan I and Cline HT. 1998. Glutamate receptor activity is required for normal development of tectal cell dendrites in vivo. *J. Neurosci.* 18:7836-7846.
- Rakic P. 1975. Role of cell interaction in development of dendritic patterns. *Adv. Neurol.* 12:117-134.
- Rakic P and Sidman RL. 1973. Organization of cerebellar cortex secondary to deficit of granule cells in weaver mutant mice. *J. Comp. Neurol.* 152 :133-162.
- Ramon y Cajal S. 1926. Sur les fibre moussues et quelques points douteux de la texture de l'ecorce cerebelleuse. *Trab. Lab. Invest. Biol : Univ. Madrid* 24:215-251.
- Ramon y Cajal S. 1911. *Histologie du Systeme nerveux de l'homme et des vertebres* . Vol 2. Paris : Maloine.

-
- Rico B, Xu B and Reichardt LF. 2002. TrkB receptor signaling is required for establishment of GABAergic synapses in the cerebellum. *Nat. Neurosci.* 5: 225 – 233.
- Rogers EE and Theibert AB. 2002. Functions of PI3-kinase in development of the nervous system. *Int. J. Develop. Neuroscience* 20: 187-197.
- Schrenk K, Kapfhammer JP and Metzger F. 2002. Altered dendritic development of cerebellar Purkinje cells in slice cultures from protein kinase Cgamma-deficient mice. *Neuroscience* 110: 675 – 689.
- Tanaka M, Tomita A, Yoshida S, Yano M and Shimizu H. 1994. Observation of the highly organized development of granule cells in rat organotypic slice cultures. *Brain Res.* 641:319-327.
- Trejo JL and Pons S. 2001. Phosphatidylinositol-3-OH kinase regulatory subunits are differentially expressed during development of rat cerebellum. *J. Neurobiol.* 47:39-50.
- Sakamoto H, Mezaki Y, Shikimi H, Ukena K and Tsutsui K. 2003. Dendritic growth and spine formation in response to estrogen in the developing Purkinje cell. *Endocrinology* 144:4466-4477.
- Schmidt R. 1962. Die postnatale Genese der Kleinhirndefekte röntgenbestrahlter Hausmäuse. *J. Hirnforsch.* 19:269-281.
- Schwartz PM, Borghesani PR, Levy RL, Pomeroy SL and Segal RA. 1997. Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF $-/-$ mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. *Neuron* 19:269-281.
- Seil FJ and Leimann AL. 1979. Development of spontaneous and evoked electrical activity of cerebellum in tissue culture. *Exp. Neurol.* 64:61-75.
- Segal RA, Pomeroy SL and Stiles CD. 1995. Axonal growth and fasciculation linked to differential expression of BDNF and NT3 receptors in developing cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 15:4970-4981.
- Shigemoto R, Abe T, Nomura S, Nakanishi S, and Hirano T. 1994. Antibodies inactivating mGluR1 metabotropic glutamate receptor block long-term depression in cultured Purkinje cells. *Neuron* 12:1245-1255.
- Shimada A, Mason C and Morrison ME. 1998. TrkB signaling modulates spine density and morphology independent dendritic structure in cultured neonatal Purkinje cells. *J. Neurosci.* 18:8559-8570.

-
- Shin BC, Suzuki M, Inukai K, Anai M, Asano T and Takata K. 1998. Multiple isoforms of the regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) are expressed in neurons in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246:313-319.
- Stoppini L, Buchs P-A and Muller D. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* 37:173-182.
- Threadgill R, Bobb K and Gosh A. 1997. Regulation of dendritic growth and remodelling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron* 19:625-634.
- Torres-Aleman I, Pons S and Santos-Benito FF. 1992. Survival of Purkinje cells in cerebellar cultures is increased by insulin-like growth factor I. *Eur. J. Neurosci.* 4:864-869.
- Tsutsui K, Ukena K, Usui M, Sakamoto H and Takase M. 2003. Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. *Neurosci. Res.* 261-273.
- Vanhaesebroeck B and Waterfield MD. 1999. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp. Cell. Res.* 253:239-254.
- Vaughn JE. 1989. Fine structure of synaptogenesis in the vertebrate central nervous system. *Synapse* 3:255-285.
- Vogel MW and Prittie J. 1995. Purkinje cells dendritic arbors in chick embryos following chronic treatment with N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J. Neurobiol.* 26:537-552.
- Wong WT and Wong ROL. 2000. Rapid dendritic movement during synapse formation and rearrangement. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10:118-124.
- Wu GY and Cline HT. 1998. Stabilization of dendritic arbour structure in vivo by CamKII. *Science* 279:222-226.
- Zou D-J and Cline HT. 1999. Postsynaptic calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is required to limit elaboration of presynaptic and postsynaptic neuronal arbors. *J. Neurosci.* 19:8909-8918.

9 ANHANG

DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich meinem Betreuer Herrn Professor Dr. Kapfhammer für die Ermöglichung dieser Arbeit am Anatomischen Institut der Universität Basel, die Tatkräftige und unkonventionelle Hilfestellung bei der Planung und Durchführung des Aufenthaltes und die intensive wissenschaftliche Betreuung.

Ich danke Herrn Professor Dr. Dr. Redies für die Betreuung der Dissertation an der Universität Jena.

Für gute wissenschaftliche und auch persönliche Ratschläge, für das konstruktive Hinterfragen und wiederholte gute Hilfestellungen danke ich Frau Doktor Radejovic und Frau Doktor Hofsäß.

Für die kontinuierliche Motivation und exzellente „technische“ Hinweise an entscheidender Stelle danke ich Esther Künzli und Frau Doktor Bendfeldt.

Ich danke meinen Eltern Hannelore und Alfred Zeyse und der Studienstiftung des deutschen Volkes für die finanzielle Ermöglichung dieser Arbeit, an der Universität Basel.

Meinem Bruder Doktor Daniel Zeyse danke ich für die Korrekturarbeiten und die hilfreichen Hinweise beim Verfassen der Arbeit.

Ich danke Herrn Mike Duis, dass er jederzeit ein offenes Ohr und wunderbare Ratschläge hatte.

LEBENS LAUF

Judith Zeyse

geboren am 04.August 1977 in Hamburg

ledig

SCHULISCHER WERDEGANG

1984 – 1988	Grundschule in Hamburg, Integrationsklasse
1988 – 1994	Albert-Schweizer-Gymnasium Hamburg, Musikalischer Zweig
1994 – 1995	Schüleraustausch an der Granville-High-School, Ohio USA
1995 – 1998	Albert-Schweizer-Gymnasium Hamburg, Abitur

STUDIUM

1998 – 2000	Vorklinisches Studium der Medizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena
	Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes
2000	Ärztliche Vorprüfung
2000 – 2005	Studium der Medizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena
	Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes
2001	1.Staatsexamen
2004	2.Staatsexamen
2005	3.Staatsexamen
2002 – 2003	Forschungsaufenthalt an der Universität Basel, Schweiz

2004 – 2005	Praktisches Jahr im Sophien- und Hufeland- Klinikum Weimar und Kantonsspital Olten, Schweiz. Wahlfach Pädiatrie.
Seit Januar 2006	Assistenzärztin der Klinik für Neurochirurgie im Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie der Johann-Wolfgang-Goethe Universität zu Frankfurt am Main.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. J. Kapfhammer, Prof. Dr. Dr. C. Redies, Dr. Daniel Zeyse, Mike Duis.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Frankfurt am Main, den

Judith Zeyse